

**EFFECTO DEL INHIBIDOR DE LA C1 ESTERASA SOBRE EL
DAÑO POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN. MODELO
EXPERIMENTAL DE COLGAJO EPIGÁSTRICO EN RATA**

Tesis doctoral presentada por
Inmaculada Masa Jurado
Licenciada en Medicina, para optar al grado de
Doctor en Medicina

Tesis doctoral realizada bajo la dirección del
Prof. Víctor Sánchez Turrión y del dr. César Casado Sánchez,
En el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres.
Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía,
Bienio 2012/2014.
Departamento de cirugía. Universidad Autonoma de Madrid.

El doctorando,

Fdo.: Inmaculada Masa Jurado.

Visto bueno de los directores,

Fdo.: Prof. Víctor Sánchez Turrión

fdo.: Dr. César Casado Sánchez

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Nunca nadie me explicó que el desarrollo de un proyecto de investigación que constituyera la base de mi tesis doctoral, sería el resultado de un apasionante trabajo en equipo. A mi inquietud y entusiasmo por este proyecto, se ha unido la colaboración desinteresada de grandes profesionales, amigos y familia. Sin ellos, esta no habría sido la misma experiencia, ni el resultado este que hoy presento.

En primer lugar me gustaría mostrar mi agradecimiento y admiración a mis directores de tesis, el Prof. Víctor Sánchez Turrión y el Dr. César Cásado Sánchez. Gracias al Prof. Víctor Sánchez Turrión, por creer en este proyecto y ofrecerme la oportunidad de realizarlo bajo su tutela. Al Dr. César Casado Sánchez quiero agradecerle que sembrara en mí la inquietud de este proyecto, que haya sido mi guía durante el camino y, sobre todo, que haya aportado ese entusiasmo y optimismo que empuja a las personas a llegar a la meta. Es un honor para mí contar contigo como compañero de profesión y amigo.

Quiero agradecer su colaboración al Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón de Cáceres. A su director científico, Francisco Sánchez Margallo, por abrir las puertas del Centro a una residente de cirugía plástica con una ilusión y un proyecto. A Carmen Calles, coordinadora de la Unidad de Microcirugía, por su apoyo durante el desarrollo del proyecto. A Alberto Ballestín, becario de la Unidad de Microcirugía, siempre dispuesto a regalar su tiempo y energía, sin su ayuda no habría llegado al final de la fase experimental. Sería un placer colaborar contigo en un futuro, espero que próximo.

A M^a Fernanda Martín, Jefa del Servicio de Farmacia del Centro en aquel momento, por facilitarme todo lo necesario para el desarrollo del proyecto. Al personal laboral del Centro, por su entusiasta colaboración.

También gracias a mis compañeros del Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora del Complejo Hospitalario de Cáceres por sus ánimos y apoyo en estos años. Gracias por tolerar las ausencias que este proyecto ha causado en ocasiones.

Al departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, en especial a Vicente Crespo por su profesionalidad exquisita con mis muestras, haciendo de mi proyecto el suyo propio. Al departamento de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, por su colaboración en el desarrollo del estudio bioquímico.

A Irene de la Casa, una gran profesional y amiga, mi asesora de emergencia, gracias por tu generosidad diaria. A mis tíos Cari y Ricardo, por vuestra disponibilidad absoluta y cariño, indescriptible lo que vuestra compañía ha supuesto para mí en este proyecto. A Gonzalo Fdez de Cordova, por regalarme el diseño de la portada de este trabajo. A Mabel, mi compañera de viaje desde siempre.

A Alejandro, por motivarme a asumir nuevos retos de forma constante y acompañarme en cada uno de ellos. A mis hermanos, Juampe y Carmen, a quienes admiro profundamente, porque estar con ellos constituye el mejor premio al intenso trabajo. A mis padres, por saber darme todas las herramientas necesarias para convertirme en lo que hoy soy, mis éxitos no son sino el resultado del suyo.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	17

I. INTRODUCCIÓN

1. COLGAJOS: CONCEPTO, ANATOMÍA Y FISIOPATOLOGÍA	23
1. 1. COLGAJOS EN CIRUGÍA PLÁSTICA	23
1. 2. CLASIFICACIÓN DE LOS COLGAJOS	24
1. 3. VASCULARIZACIÓN DE LOS COLGAJOS CUTÁNEOS	30
1. 4. COMPLICACIONES: MALA EVOLUCIÓN TISULAR	37
1. 5. INCREMENTO DE LA VIABILIDAD DEL COLGAJO	43
2. SÍNDROME POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN	47
2. 1. DEFINICIÓN Y CONCEPTOS RELACIONADOS	47
2. 2. MECANISMOS DEL SÍNDROME POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN	49
2. 3. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN EN COLGAJOS	65
3. PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO	73
3. 1. DEFINICIÓN Y CONCEPTOS RELACIONADOS	73
3. 2. FISIOPATOLOGÍA DEL PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO	75
3. 3. USOS TERAPÉUTICOS	76
4. INHIBIDOR DE LA C1 ESTERASA	78
4. 1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	78
4. 2. MECANISMO DE ACCIÓN	79
4. 3. USOS TERAPÉUTICOS	82

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

III. OBJETIVOS

1. GENERAL	93
2. ESPECÍFICOS	93

IV. MATERIAL Y MÉTODO	95
1. ANIMALES	97
1. 1. RATA WISTAR: CARACTERÍSTICAS GENERALES	97
1. 2. RATA WISTAR: PARÁMETROS	98
2. MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES	100
3. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	102
3. 1. COLGAJO EPIGÁSTRICO DE RATA	102
3. 2. TÉCNICA QUIRÚRGICA	102
3. 3. INDUCCIÓN DEL SÍNDROME POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN	105
3. 4. PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO	108
3. 5. PAUTA DE ADMINISTRACIÓN DEL C1-INH	109
4. DISEÑO DEL ESTUDIO	110
5. SACRIFICIO Y TOMA DE DATOS	113
6. MATERIAL EMPLEADO	116
6. 1. MANTENIMIENTO Y TERAPIA	116
6. 2. SACRIFICIO DE ANIMALES	117
6. 3. TOMA DE MUESTRAS	117
7. PARÁMETROS ANALIZADOS	118
7. 1. PARÁMETROS CLÍNICOS	118
7. 2. PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS	118
7. 3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	119
8. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICOS	120
9. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS	121
10. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	126
10. 1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS: HOMOGENIZADO	126
10. 2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	127
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	133
11. SOPORTE BIBLIOGRÁFICO	135
12. TRATAMIENTO INFORMÁTICO	136
14. ÉTICA Y LEGISLACIÓN DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO	137

V. RESULTADOS	139
1. RESULTADOS EN LOS GRUPOS SIN TRATAMIENTO	143
2. RESULTADOS EN LOS GRUPOS CON TRATAMIENTO	146
2. 1. RESULTADOS TRAS LA APLICACIÓN DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO	146
2. 2. RESULTADOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DEL C1-INH	148
2. 3. RESULTADOS TRAS EL TRATAMIENTO CONJUNTO DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y C1-INH	151
3. COMPARATIVA DE LAS DISTINTAS OPCIONES TERAPEÚTICAS ESTUDIADAS	154
3. 1. TRATAMIENTO CON PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO VS C1-INH	154

3. 2. TRATAMIENTO CON PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO VS TRATAMIENTO CONJUNTO DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y C1-INH	156
3. 3. TRATAMIENTO CON C1-INH VS TRATAMIENTO CONJUNTO DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y C1-INH	158
VI. DISCUSIÓN	161
1. DISCUSIÓN DEL MÉTODO EXPERIMENTAL DE INVESTIGACIÓN	163
1. 1. ANIMAL DE ESTUDIO: RATA WISTAR	163
1. 2. MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN	166
1. 3. GRUPOS DE ESTUDIO	168
1. 4. APLICABILIDAD DEL ESTUDIO	174
2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	175
2. 1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN LOS GRUPOS SIN TRATAMIENTO	175
2. 2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN LOS GRUPOS CON TRATAMIENTO	179
2. 3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES OPCIONES TERAPEÚTICAS ESTUDIADAS	184
VII. CONCLUSIONES	187
VIII. BIBLIOGRAFÍA	191

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regulación del flujo sanguíneo del colgajo	34
Tabla 2. Cantidades y orden de adición de reactivos para la determinación de proteínas. Volúmenes en µl. St: estándar, BSA: albúmina sérica bovina.	128
Tabla 3. Cantidades y orden de adición de reactivos para realizar el análisis de GSH. Volúmenes en µl. St: estándar, GSH: glutatión reducido, OPA: ácido ortoftaldehído.	130
Tabla 4. Cantidades y orden de adición de reactivos para realizar el análisis de MDA. Volúmenes en µl. St: estándar, MDA: malonildialdehído , TCA: ácido tricloroacético, TBA: ácido 2-tiobarbitúrico.....	131
Tabla 5. Clasificación de las variables estudiadas para la valoración de los parámetros clínicos.	133
Tabla 6. Clasificación de las variables estudiadas para la valoración de los parámetros anatomopatológicos.	133
Tabla 7. Clasificación de las variables estudiadas para la valoración de los parámetros bioquímicos.	134
Tabla 8. Resultados de los parámetros clínicos para cada uno de los grupos.....	141
Tabla 9. Resultados de los parámetros anatomopatológicos para cada uno de los grupos de estudio.	142
Tabla 10. Resultados de los parámetros bioquímicos para cada uno de los grupos de estudio.	142
Tabla 11. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo control (Grupo 0) y en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1).	143
Tabla 12. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo control (Grupo 0) y en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1).	144
Tabla 13. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo control (Grupo 0) y en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1).....	145
Tabla 14. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2).	146
Tabla 15. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2).....	147
Tabla 16. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2).....	148
Tabla 17. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).....	149
Tabla 18. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).....	149

Tabla 19. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo de isquemia reperfusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).....	150
Tabla 20. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo de isquemia reperfusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).	151
Tabla 21. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo de isquemia reperfusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).....	152
Tabla 22. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo de isquemia reperfusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).....	153
Tabla 23. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).....	154
Tabla 24. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).....	155
Tabla 25. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).....	156
Tabla 26. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).....	156
Tabla 27. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).....	157
Tabla 28. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).....	158
Tabla 29. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).	158
Tabla 30. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).....	159
Tabla 31. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).....	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la fisiopatología del síndrome por IR.....	51
Figura 2. Producción de RLO en el síndrome por IR.	53
Figura 3. Esquema del sistema del complemento: vías clásica, de la lecitina y alternativa.	63
Figura 4. Representación esquemática de preacondicionamiento (PreC) y postacondicionamiento (PostC) isquémicos.	74
Figura 5. Mascarilla para mantenimiento anestésico.	103
Figura 6. Diseño preoperatorio del colgajo epigástrico.	104
Figura 7. Colgajo epigástrico izquierdo elevado en isla, se observa pedículo epigástrico esqueletonizado.	105
Figura 8. Clamp microvascular localizado en los vasos femorales.	106
Figura 9. Retirada del clamp microvascular tras el período de isquemia primaria.....	106
Figura 10. Marcaje preoperatorio del colgajo epigástrico (izquierda arriba). Aspecto del colgajo en el postoperatorio inmediato, tras clampaje del pedículo femoral, ligeramente congestivo (derecha arriba). Aspecto congestivo del colgajo tras 8 horas de isquemia, previo a la reperusión del mismo (izquierda abajo). Signos de reperusión inicial minutos de liberar el clamp femoral (derecha abajo).	107
Figura 11. Manufactura y colocación del vendaje protector.....	108
Figura 12. Esquema de actuación en el grupo control.	110
Figura 13. Esquema de actuación en el grupo 1.	110
Figura 14. Esquema de actuación en el grupo 2.	111
Figura 15. Esquema de actuación en el grupo 3.	111
Figura 16. Esquema de actuación en el grupo 4.	112
Figura 17. Ejemplos de fotografías clínicas recogidas en el 7º día postoperatorio.	113
Figura 18. Recogida y división del colgajo para la toma de muestras.....	114
Figura 19. Conservación de la muestra para el estudio bioquímico.	115
Figura 20. Conservación de la muestra para el estudio histopatológico.....	115
Figura 21. Medición del área total del colgajo y del área desvitalizada en píxeles, con ImageJ.	120
Figura 22. Prosección de la muestra. Izquierda: muestra completa tras fijación. Centro: corte del extremo distal del colgajo a 1 cm del hilo de sutura y tinción del mismo. Derecha: corte del extremo proximal del colgajo a 1 cm del hilo de sutura y corte longitudinal de la muestra para su estudio.....	122
Figura 23. Diferentes tinciones utilizadas. Corte histológico de piel teñida con Hematoxilina-Eosina (izquierda) y Tricrómico de Masson (derecha). Se diferencia la epidermis (*), la dermis (papilar y reticular) (▲), la capa muscular (◆) y el tejido celular subcutáneo (→). Magnificación original x4.	123
Figura 24. Diferentes grados de edema. Edema leve (izquierda): dispersión de los elementos celulares sin desvirtuarse el patrón arquitectural del tejido. Edema moderado (centro). Edema intenso (derecha): células más separadas por el aumento	

de líquido intersticial con desaparición del patrón tisular. Hematoxilina-Eosina, magnificación original x10.	124
Figura 25. Diferentes grados de infiltrado inflamatorio. Infiltrado inflamatorio de intensidad leve/moderada (derecha) con predominio de linfocitos y células plasmáticas (▲). Infiltrado inflamatorio severo (izquierda) con predominio de leucocitos polimorfonucleares (*). Hematoxilina-Eosina, magnificación original x20.....	124
Figura 26. Neoformación de vasos (*) en el tejido celular subcutáneo. Ligera neovascularización (derecha) e intensa (izquierda). Tricrómico de Masson, magnificación original x20.	125
Figura 27. Esquema del procesado de las muestras.....	127
Figura 28. Experiencia con collarín: se aprecian signos de sufrimiento en los ojos y pelaje del animal(izquierda); autocanibalismo a pesar del uso de collarín (derecha).	165
Figura 29. Manufactura y colocación del vendaje protector.....	165
Figura 30. Rata del estudio al 7º día (recogida de muestras). Se observa el colgajo intacto y la porción abdominal del vendaje protector mordida.	166

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Colgajos: concepto, anatomía y fisiopatología

1. 1. COLGAJOS EN CIRUGÍA PLÁSTICA

La cirugía plástica es el área del conocimiento médico ocupada de la reparación de estructuras, de cara a corregir una alteración en la forma o en la función corporal. Los colgajos constituyen una parte fundamental en el arsenal terapéutico del cirujano plástico.

El concepto de colgajo hace referencia a un tejido movilizado sobre su base vascular. De manera que un colgajo contiene un aporte vascular intrínseco responsable de su viabilidad, siendo esta su diferencia fundamental con un injerto, que depende del lecho receptor para su supervivencia. Debido a esta característica fundamental de los colgajos, es imprescindible el conocimiento de la base anatómica vascular de los tejidos para optimizar los resultados de la reconstrucción de un defecto tisular.

La historia de la cirugía plástica está inevitablemente ligada a la evolución de los colgajos y al conocimiento de su fisiopatología. La primera reconstrucción con colgajos se le atribuye al hindú Sushruta Samhita¹, en el año 600 d. C, quien describió la reconstrucción de un defecto nasal mediante colgajos regionales faciales. Posteriormente, también de la India, la familia Kanghiara informó alrededor del año 1000 d.C. sobre la reconstrucción de un defecto nasal con un colgajo frontal. Ya en 1597, Tagliacozzi² dejó

reflejada la descripción clásica de un colgajo tubular pediculado del brazo para la reconstrucción nasal.

En todos estos casos, la viabilidad del colgajo se tomó de forma empírica, sin conocer cómo ni por qué funcionaba su vascularización. No es hasta los años iniciales del siglo XX cuando se desarrollan las teorías que explican la fisiología vascular de los colgajos.

1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS COLGAJOS

Los colgajos pueden ser clasificados en base a diferentes criterios:

- Según la composición del tejido transferido pueden clasificarse en simples (formados por un solo tejido: cutáneo, muscular, etc.) o compuestos (formados por más de un tejido: musculocutáneo, fasciocutáneo, etc.).
- Según la proximidad al defecto consideramos un colgajo local, regional o a distancia.
- Según la forma de movimiento del colgajo se pueden clasificar como colgajo de rotación, de transposición, de avance, etc.
- Según el tipo de vascularización hablaremos de colgajo con patrón aleatorio (“al azar”), axial pediculado (basado en un pedículo vascular conocido que mantiene su continuidad al movilizar el colgajo) o axial libre (cuyo pedículo vascular conocido es dividido y reanastomosado en la zona receptora).

- Según la manipulación previa a la transferencia podemos hablar de colgajo diferido, expandido, etc.
- Según otras características: sensitivo, tendinoso, etc.

Hasta bien pasada la mitad del siglo XX, todos los colgajos conocidos se consideraban cutáneos y de patrón vascular aleatorio, y por tanto sujetos a una estricta relación base/altura que asegurase su viabilidad. Abordar la clasificación de estos colgajos era sencilla: el diseño de su movilización, su geometría o destino eran características suficientes para su descripción³.

En 1970, Milton⁴ demuestra que la relación base/altura es arbitraria, siendo la extensión de la red vascular incluida en el territorio del colgajo lo que realmente predice la viabilidad del mismo. Pocos años después, McGregor y Jackson⁵ establecen las bases anatómicas que permiten distinguir entre colgajos randomizados (basados en un flujo vascular aleatorio) o axiales (basados en un pedículo vascular concreto). Estos estudios suponen el renacimiento del desarrollo de los colgajos, comienza a establecerse la anatomía vascular de los tejidos permitiendo la descripción de colgajos musculocutáneos⁶, fasciocutáneos⁷, basados en perforantes⁸, etc.

Ya en 1977, Converse⁹ declaró que "no existe un método simple que abarque todo el sistema necesario para clasificar los colgajos, aceptándose que la base anatómica vascular del colgajo proporciona el método más exacto para su clasificación".

El "sistema atómico" de Tolhurst¹⁰ permite definir todas las características que definen un colgajo. En su clasificación, Tolhurst considera como núcleo de este sistema

la composición del colgajo y en un papel secundario el resto de características, incluida la vascularización del mismo. En cambio, Cormark y Lamberty¹¹ proponen como principal característica la vascularización del colgajo en su “sistema anatómico”, que se recoge en su clasificación nemotécnica de las “6 Cs” (“*Circulación*”, “*Componentes*”, “*Conformación*”, “*Contiguidad*”, “*Contrucción*” y “*preaCondicionamiento*”).

1. 2. 1. Colgajos cutáneos.

Los colgajos cutáneos están compuestos por un segmento de piel y tejido celular subcutáneo que mantiene el contacto con las estructuras profundas a través de un pedículo vascular.

Un colgajo cutáneo puede estar irrigado a través de un sistema cutáneo indirecto que depende de arterias procedentes de perforantes musculocutáneas o fasciocutáneas. En este caso el diseño de su pedículo vascular es aleatorio, conociéndose entonces como colgajos randomizados. Clásicamente, un colgajo rectangular tallado al azar es viable cuando su longitud no sobrepasa 1,5 veces la longitud de su base. Por otra parte, la distribución variable de las redes vasculares dérmicas y subdérmicas en las distintas regiones corporales puede explicar la supervivencia de los colgajos con diferencias en la relación entre la longitud y la base mencionada anteriormente.

En otras ocasiones el colgajo se talla en relación con un sistema cutáneo directo, es decir, en torno a las arterias que circulan paralelas a la piel y se dirigen específicamente al territorio cutáneo del colgajo. Este tipo de diseño se denomina colgajo

de patrón axial. Inicialmente se trataba de colgajos pediculados, en los que el pedículo del colgajo incluye un puente cutáneo que irriga directamente la piel del colgajo. Posteriormente, se fueron diseñando también colgajos en isla (individualizando su pedículo vascular) o colgajos libres (transferidos mediante técnicas microquirúrgicas al territorio receptor).

Con la descripción de los colgajos fasciocutáneos esta clasificación queda obsoleta, puesto que muchos de los colgajos descritos como axiales son en realidad fasciocutáneos basados en la rica red vascular incluida en la fascia.

1. 2. 2. Colgajos fasciocutáneos.

El sistema vascular fasciocutáneo está compuesto por los distintos plexos dérmico, subdérmico y fascial, estando intensamente relacionados entre sí. Están irrigados por múltiples vasos que acceden al plexo fascial a través de los septos musculares (perforantes septocutáneas) o de los propios músculos (perforantes musculocutáneas).

Los colgajos fasciocutáneos se definen por la presencia del plano aponeurótico o fascial en su composición. Aunque, considerando la anatomía vascular cutánea, algunos autores consideran como colgajo fasciocutáneo aquel que está compuesto por todas o alguna de las capas presentes entre la piel y la fascia profunda, puesto que en última instancia es el plexo fascial quien lo nutre¹².

Mathes y Nahai clasifican los colgajos fasciocutáneos según su patrón vascular¹³:

- Colgajo tipo A: dependiente de un pedículo que penetra por la base y se orienta en sentido longitudinal del colgajo, paralelamente a la rama fundamental del plexo fascial, sin atravesar ningún músculo.
- Colgajo tipo B: un pedículo septocutáneo, constante tanto en presencia como en localización, que discurre entre distintos grupos musculares.
- Colgajo tipo C: basado en un pedículo perforante musculocutáneo, que contribuye en la irrigación fascial y cutánea.

1. 2. 3. Colgajos musculares y musculocutáneos.

Son colgajos compuestos por tejido muscular exclusivamente o en asociación con un segmento cutáneo formando un colgajo compuesto (musculocutáneo). Estos colgajos ofrecen la ventaja de una importante vascularización. Por otra parte, es indispensable el conocimiento en profundidad de la anatomía del pedículo vascular para asegurar su viabilidad. En algunas circunstancias, los colgajos musculares han sustituido a los colgajos cutáneos en la cobertura de defectos de tejido blando, sobre todo en presencia de infección y traumatismos.

En 1981, Mathes y Nahai¹⁴ propusieron una clasificación vascular de los músculos, importante para el diseño de colgajos musculocutáneos. Esta clasificación se basa fundamentalmente en el número de pedículos vasculares que penetran en el músculo, su dominancia, la fuente del vaso sanguíneo y su localización en relación al origen e inserción muscular. Existen cinco tipos musculares:

- Tipo I: músculos irrigados por un pedículo vascular único.
- Tipo II: músculos que presentan un pedículo vascular dominante junto a varios pedículos menores. El pedículo dominante tiende a penetrar por el vientre o el origen muscular, mientras que los accesorios penetran por la porción más distal. Dependiendo del grado de desarrollo de las anastomosis intramusculares, el vaso dominante puede ser capaz de irrigar el músculo entero. La posibilidad de supervivencia del islote cutáneo en un colgajo musculocutáneo, será mayor cuando se localice sobre la porción muscular irrigada por la arteria dominante.
- Tipo III: músculos con dos pedículos dominantes independientes de dos regiones arteriales distintas. Igualmente, la capacidad de que una sola arteria supla el músculo completo dependerá de la calidad de las uniones anastomóticas. La isla cutánea en un colgajo musculocutáneo podría tomarse de uno u otro lado.
- Tipo IV: músculos con múltiples pedículos de tamaño similar entrando por distintos puntos del vientre muscular (vascularización segmentaria). El territorio potencial que puede irrigar cada vaso dependerá de las anastomosis que, por lo general, suelen ser pobres y moderadamente diferenciadas. La piel suprayacente no está irrigadas por perforantes musculares sino por arterias fasciocutáneas, por lo que no podría tomarse un islote cutáneo
- Tipo V: Posee un pedículo vascular dominante con múltiples pedículos secundarios segmentarios. Los vasos segmentarios son, en realidad, ramas que atraviesan el músculo para irrigar la piel que, en su trayecto, se anastomosan con vasos intramusculares. Gracias a estas uniones, el pedículo principal es capaz de irrigar la piel en el caso de los colgajos musculocutáneos.

1.3. VASCULARIZACIÓN DE LOS COLGAJOS CUTÁNEOS

1.3.1. Anatomía de la vascularización cutánea

Los estudios de Manchot^{15,16} y Salmon^{17,18} establecieron la base de los conocimientos actuales sobre la vascularización cutánea. En 1987, Taylor y Palmer aprovecharían esos conceptos para describir una división anatómica del cuerpo en territorios vasculares tridimensionales llamados angiosomas. Un angiosoma se corresponde con el territorio cutáneo irrigado por una arteria y su vena accesoria, quedando dividido en un territorio arterial (arteriosoma) y otro venoso (venosoma). Se considera que cada angiosoma definiría los límites seguros de un tejido que puede ser transferido de manera independiente. Estos territorios cutáneos mantienen una estrecha conexión con otros angiosomas adyacentes a través de anastomosis verdaderas (vasos del mismo calibre que las arterias principales) o de anastomosis de reducido calibre que denominamos “vasos de choque”.

Las venas cutáneas también forman una red tridimensional de canales interconectados bien desarrollada. Aunque la mayoría de estas venas poseen válvulas para crear un flujo unidireccional, a menudo están interconectadas por venas avalvulares que permiten el flujo bidireccional entre territorios venosos adyacentes. La identificación de estos vasos bidireccionales (sistema oscilante) ha permitido un mejor entendimiento de la disección y supervivencia de los colgajos.

Considerando estas bases anatómicas, podemos describir:

- Territorio anatómico: territorio de perfusión normal en reposo de la arteria.
- Territorio dinámico: territorio vecino anastomótico cuyo pedículo se ha seccionado. En caso de ocluir una arteria de uno de los dos territorios vecinos, se produce una disminución de presión en la zona ocluida y un cambio del equilibrio vascular, reajustándose el flujo para complementar la zona desvascularizada. De esta forma, un colgajo puede ser disecado con una isla cutánea que incluya un segmento del territorio adyacente, y ser viable gracias a las anastomosis a nivel de los vasos de choque, cuando en la zona contigua disminuye la presión.
- Territorio potencial: territorio más lejano que podría ser perfundido si la riqueza de redes anastomóticas lo permitiese. Cuando se difiere un colgajo existe una vasodilatación de los vasos existentes, principalmente a nivel de los vasos de choque, sin que esto implique la formación de neovasos. Esto posibilita incluir amplios territorios cutáneos inicialmente inviables.

Esta ingeniosa disposición de la anatomía vascular permite un equilibrio entre el flujo de sangre aferente al lecho capilar y la presión con la que lo hace, y proporciona el marco para un retorno venoso reducido pero a presión constante.

1. 3. 2. Regulación de la vascularización cutánea

Fisiología vascular cutánea

Para entender los cambios hemodinámicos que suceden en un colgajo cutáneo es importante tener un conocimiento general de la fisiología de la vascularización cutánea. Dado que la viabilidad del colgajo depende del equilibrio crítico entre el flujo de sangre y la demanda metabólica, es importante tener en cuenta en el diseño, ejecución y manipulación del tejido, las necesidades específicas de flujo sanguíneo para optimizar la supervivencia del colgajo.

El flujo sanguíneo total de la piel en condiciones normales es de 20 ml/min por 100 gr, e incrementa de manera importante en situaciones de hipertermia o bloqueo agudo de la inervación simpática. La regulación de la circulación sanguínea cutánea se efectúa a doble nivel, sistémico y local o autorregulación (tabla 1).

El control sistémico implica regulación neural y humoral³:

- Neural: el sistema nervioso simpático provee directamente inervación a los vasos y es, indirectamente, uno de los mayores condicionantes del tono vascular basal, mediante el control de la función de las anastomosis arteriovenosas. Los receptores alfa adrenérgicos y los receptores serotoninérgicos inducen vasoconstricción. Los receptores beta adrenérgicos inducen vasodilatación.
- Humoral: la regulación humoral ocurre a través de la acción sistémica de sustancias vasoactivas en los receptores específicos, como la epinefrina y

la norepinefrina con acción vasoconstrictora en los receptores alfa adrenérgicos. Otros vasoconstrictores sistémicos son el tromboxano A_2 y la prostaglandina F_2 . Dentro de los vasodilatadores sistémicos se incluyen la prostaglandina E_1 , la prostaglandina I_2 (prostaciclina), la histamina, la bradicinina y los leucotrienos C_4 y D_4 .

El control local es más importante en tejidos de alto gasto energético, y los principales factores implicados son:

- Los factores metabólicos que afectan el flujo sanguíneo cutáneo a nivel local incluyen la hipercapnia, hipoxia y acidosis, todos provocando vasodilatación.
- Existen factores físicos que afectan la regulación del flujo sanguíneo. El incremento de la presión de perfusión tisular puede desencadenar una distensión miogénica, provocando la vasoconstricción en un intento de mantener constante el flujo capilar, independientemente de la presión de perfusión arterial. Este mecanismo actúa fundamentalmente en arteriolas menores de 100 micras y tiende a mantener un flujo sanguíneo continuo a pesar de incrementos de presión. La hipotermia provoca vasoconstricción por su acción directa sobre el músculo liso, mientras que la hipertermia causa el efecto contrario.

Los factores reológicos pueden tener un efecto sobre el flujo sanguíneo, pero típicamente en condiciones anómalas. La anemia tiende a incrementarlo, sobre todo a nivel distal. Otros factores como la policitemia o la drepanocitosis, pueden comprometer seriamente la perfusión, especialmente en porciones marginales.

El óxido nítrico (NO) es el mediador final común para muchas sustancias que realizan su función sobre la pared del vascular. Así, la serotonina, trombina, adenosina difosfato (ADP) e histamina producen la vasodilatación mediante la liberación de NO.

El endotelio juega un papel crítico en la regulación del flujo sanguíneo a través de la liberación de sustancias vasoactivas y de su efecto en los leucocitos y plaquetas.

La acción de la cicloxigenasa provoca la formación de tromboxano y prostaglandinas. El tromboxano A₂ es un potente vasoconstrictor e inductor de la agregación plaquetaria. Así, tanto los inhibidores de la síntesis de tromboxano como la prostaciclina (prostaglandina I₂, vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria), han demostrado su utilidad en el incremento en la supervivencia de los colgajos¹⁹⁻²².

Nivel	Categoría	Agente	Mediador	Efecto
Sistémico	Neural	Fibras simpáticas	Receptor alfa adrenérgico	Vasoconstricción
	Neural	Fibras simpáticas	Receptor beta adrenérgico	Vasodilatación
	Neural	Fibras simpáticas	Receptor serotoninérgico	Vasoconstricción
	Humoral	Norepinefrina, epinefrina		Vasoconstricción
	Humoral	Serotonina, tromboxanoA ₂ , prostaglandinaF _{2α}		Vasoconstricción
	Humoral	ProstaglandinaE ₁ , ProstaglandinaI ₂ (prostaciclina), Histamina, Bradicinina, Leucotrienos C ₄ , D ₄		Vasodilatación
	Reológico	Anemia		Aumento flujo sanguíneo
	Reológico	Policitemia, Drepanocitosis		Disminución flujo sanguíneo
Local		Hipercapnia, hipoxia, acidosis, hipertermia		Vasodilatación
		Hipotermia		Vasoconstricción
		Reflejo miogénico	Aumento perfusión tisular	Vasoconstricción

Tabla 1. Regulación del flujo sanguíneo del colgajo

Los tejidos musculares, a diferencia de los tejidos cutáneos, no presentan anastomosis arteriovenosas. El músculo, como otros tejidos de gran demanda metabólica, es muy dependiente de la autorregulación para mantener los niveles de flujo sanguíneo. Dado que el músculo, a diferencia de la piel, no es un órgano termorregulador, los cambios de temperatura provocan menos efectos sobre el flujo sanguíneo a este nivel. Además, la epinefrina, que a nivel cutáneo provoca vasoconstricción, provoca vasodilatación arteriolar en el lecho muscular.

Fisiopatología vascular en el colgajo cutáneo

El hecho de disecar un colgajo provoca cambios que alteran el equilibrio regulador del flujo sanguíneo. La pérdida inmediata de la inervación simpática, combinada con la caída de la presión de perfusión por la sección de vasos aferentes, provocan una isquemia aguda en las porciones periféricas. Son los cambios a nivel de la microcirculación a partir de este momento los que determinan la supervivencia de esos segmentos del colgajo²³: inicialmente una fase hiperadrenérgica aguda es seguida por una fase noradrenérgica, con una vasodilatación significativa, y finalmente un aumento de perfusión capilar hiporreactiva a sustancias vasoactivas.

Los cambios anatómicos, hemodinámicos y metabólicos que ocurren tras la elevación del colgajo, determinan en última instancia el resultado final. Pese a una adecuada perfusión en la base del colgajo tras la elevación del mismo, ésta disminuye en la región distal habitualmente un 20% entre las primeras 6 y 12 horas, alcanza el 75% de la normalidad entre la primera y segunda semana, y el 100% entre la tercera y cuarta²⁴⁻²⁸.

Al mismo tiempo que el flujo sanguíneo regresa a las porciones isquémicas del colgajo, por el flujo aferente del pedículo, un flujo adicional lo alcanza por inoculación desde el lecho.

Los colgajos musculocutáneos tienen un incremento continuo y temprano en el flujo sanguíneo tras la elevación del colgajo, mientras que los colgajos cutáneos de flujo aleatorio tienen un descenso temprano²⁹. Estos, sin embargo, desarrollan un incremento del flujo en fases posteriores. Las tensiones de oxígeno son también significativamente mayores en los colgajos musculocutáneos respecto a los colgajos cutáneos hasta el sexto día tras la elevación, y en ambos tipos son significativamente mayores en las porciones proximales (más importante en los colgajos randomizados). Estas diferencias en los patrones de oxígeno explicarían entre otras cosas, el importante papel de los colgajos musculares empleados en presencia de infección³⁰⁻³².

La evolución del colgajo podría resumirse según lo siguiente: durante las primeras 12 a 18 horas el flujo disminuye drásticamente, especialmente en la porción distal del colgajo, debido a la combinación del descenso en la perfusión y la liberación de los vasoconstrictores simpáticos, y el progresivo daño endotelial mediado por los leucocitos. Para que la porción distal sobreviva, debe existir un flujo suficiente durante las primeras 6 a 12 horas. Como los neurotransmisores simpáticos son eliminados completamente en las siguientes 12 a 24 horas, y el inicio de la neovascularización desde el lecho ocurre entre el segundo y tercer día, la perfusión del colgajo se restablece progresivamente. Sin embargo, en las porciones distales del colgajo que sufren isquemia severa en las primeras 6 a 12 horas, el restablecimiento del flujo contribuiría con el síndrome por isquemia

reperfusión (IR), que resultaría finalmente en un colapso microvascular y la necrosis tisular.

1.4. COMPLICACIONES: MALA EVOLUCIÓN TISULAR

Múltiples factores influyen en la viabilidad de un colgajo, y su análisis es interesante para minimizar las posibilidades de necrosis total o parcial del mismo. El tipo de colgajo es un dato a valorar en cuanto a los distintos requerimientos nutricionales de los tejidos. De este modo, los colgajos cutáneos, dado su menor gasto energético comparados con los colgajos musculares, presentan una mayor tolerancia a los períodos de isquemia que éstos últimos.

Las causas que determinan una mala evolución tisular en los colgajos se pueden clasificar en intrínsecas o dependientes puramente del diseño, anatomía y fisiopatología del colgajo, o extrínsecas como factores externos que influyen sobre el resultado final.

1.4.1. Factores intrínsecos

Factores intrínsecos: insuficiencia vascular arterial.

La necrosis distal de los colgajos cutáneos ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista fisiopatológico concluyendo que se debe a un flujo sanguíneo inadecuado. Tras la elevación del colgajo, la zona más próxima al colgajo presenta una disminución del flujo sanguíneo como consecuencia de la simpatectomía, de la liberación de

catecolaminas y de la respuesta local. Sin embargo, en la zona distal, la isquemia local produce una intensa vasodilatación que no consigue aportar un flujo sanguíneo adecuado a este nivel por la deficiente presión sanguínea en la porción proximal del colgajo. Por lo tanto, una presión de perfusión insuficiente es en última instancia la causa de la necrosis distal^{27,28,33,34}.

Kerrigan³⁵ describe tres situaciones generales que pueden determinar la isquemia del colgajo: un diseño inadecuado en colgajos excesivamente largos en relación con su aporte vascular intrínseco, la trombosis arterial y la trombosis venosa. En el caso de los colgajos pediculados, la trombosis suele estar en relación con una presión de perfusión baja; mientras que en los colgajos libres se debe principalmente a errores en la técnica de microanatomosis vascular.

La oxigenación desempeña un papel crítico en la evolución tisular. Valores transcutáneos de presión parcial de oxígeno (TcPO₂) mayores de 50 mmHg se asocian con una buena evolución de los tejidos tras intervenciones quirúrgicas. Un valor de TcPO₂ menor de 40 mmHg se asocia a diversas complicaciones. Las causas más frecuentes de insuficiencia vascular serían la patología macrovascular (enfermedad aterosclerótica) o microvascular, etiología farmacológica, traumática y desórdenes vasoespásticos. En la práctica clínica, las causas más habituales son:

- El shock hipovolémico tras un traumatismo provoca un descenso en la perfusión tisular periférica, con el objetivo de preservar un flujo sanguíneo adecuado en los órganos centrales. La adecuada administración de fluidos en estas circunstancias mejora las posibilidades de supervivencia de los tejidos.

- La aterosclerosis constituye la enfermedad macrovascular más frecuente. Los factores más relevantes que condicionan el desarrollo de aterosclerosis incluyen la diabetes mellitus, la edad avanzada, la menopausia, el tabaquismo, la hipertensión arterial, la obesidad y el sedentarismo. La placa aterosclerótica es la consecuencia del acúmulo focal de leucocitos y tejido muscular liso a nivel de la íntima arterial. Su crecimiento depende del acúmulo de la matriz extracelular y de los depósitos lipídicos. Debido al daño vascular que se produce, se alcanza un estado isquémico que desemboca en el infarto y muerte celular.
- La exposición a radiación tiene mayor efecto a nivel de la microcirculación. Las células más sensibles son las endoteliales, los fibroblastos y los queratinocitos. El daño originado es dosis dependiente y acumulativo a lo largo del tiempo.
- Ciertos medicamentos pueden provocar insuficiencia vascular por cambios en la microcirculación. La nicotina es el principal componente vasoactivo del tabaco, incluyendo entre sus efectos perjudiciales el desarrollo de una lesión endotelial, el enlentecimiento del flujo capilar y la liberación de catecolaminas. También estimula el tromboxano A₂ (vasoconstrictor), provoca la liberación de monóxido de carbono (disminuye la capacidad sanguínea del transporte de oxígeno) y aumenta la adherencia plaquetaria. A pesar de no alterar la microanastomosis en microcirugía, afectaría el resultado final por su acción sobre la microcirculación.
- En la vasoconstricción observada en enfermedades vasoespásticas como la enfermedad de Raynaud, el vasoespasmo episódico provoca la oclusión arteriolar distal, en respuesta al frío o a un estímulo emocional.

Factores intrínsecos: insuficiencia vascular venosa.

En condiciones normales las contracciones musculares dirigen el flujo venoso hacia el sistema profundo. En la insuficiencia venosa el flujo es dirigido al sistema superficial, provocando hipertensión venosa a ese nivel. Ésta se relaciona con el reflujo venoso (a través de la incompetencia de las venas comunicantes del sistema profundo), la obstrucción venosa y la disfunción muscular.

Los tejidos desarrollan entonces fibrosis pericapilar, isquemia tisular y liberación de radicales libres de oxígeno (RLO). El incremento de la presión endovenosa se traduce en un edema tisular que contribuirá a la hipoxia tisular (por el incremento de la distancia que el oxígeno debe difundir desde los capilares sanguíneos a las células).

El déficit del retorno venoso puede provocar necrosis del colgajo pese a un adecuado flujo arterial³⁶. En modelos experimentales de isquemia primaria arterial y venosa, se observa que la isquemia venosa es incluso más agresiva que la arterial³⁷⁻³⁹.

Factores intrínsecos: daño por isquemia reperfusión.

Los colgajos cuyo aporte vascular queda interrumpido por un período de tiempo (isquemia primaria) sufren un proceso fisiopatológico denominado daño por IR. Durante la isquemia, el tejido sufre un daño secundario a la anoxia celular que si se prolonga lo suficiente, determina la necrosis tisular. Las reservas de ATP se agotan, fallan las bombas

de membrana, y se acumulan toxinas que en última instancia generan la destrucción de las estructuras intracelulares. La reperfusión del colgajo, lejos de ser un proceso beneficioso, también produce daño a nivel celular. En esta fase los neutrófilos se activan y se acumulan los mediadores inflamatorios al tiempo que se liberan RLO y enzimas proteolíticas^{8,40}.

Debido a la importancia de este proceso en nuestro estudio, estudiaremos en detalle la fisiopatología del daño por IR más adelante en este texto.

1. 4. 1. Factores extrínsecos

El éxito o fracaso de una cirugía reconstructiva puede depender también de factores ajenos al diseño y fisiopatología del colgajo. En este sentido, es importante considerar los antecedentes patológicos del paciente. Determinadas enfermedades afectan a la vascularización de los tejidos (como la diabetes mellitus que afecta principalmente a la microcirculación de los tejidos o la arteriosclerosis vascular que condiciona una insuficiencia macrovascular). Es especialmente relevante el hábito tabáquico como factor determinante de vasoconstricción arterial y su influencia en el desarrollo de arteriosclerosis.

Un proceso infeccioso concomitante en el período perioperatorio también presenta un efecto deletéreo que puede inducir la necrosis parcial o total de un colgajo. La infección tisular queda definida cuando el recuento bacteriano en los tejidos valorados sobrepasa las 10^5 bacterias por gramo de tejido. Esta circunstancia disminuye la presión

parcial de oxígeno tisular y prolonga la fase inflamatoria, perjudica la quimiotaxis, la migración leucocitaria y la fagocitosis. También afecta la angiogénesis y la epitelización. El estado de sepsis altera el proceso inflamatorio y proliferativo en los tejidos afectados por una lesión tisular.

Por otra parte, maniobras intempestivas sobre el colgajo, la compresión inadecuada sobre el pedículo o el desarrollo de hematomas, son factores mecánicos que pueden determinar la mala evolución tisular del colgajo. La hipotermia como factor desencadenante de vasoconstricción vascular es un elemento a controlar tanto en el período intraoperatorio como en los primeros días postquirúrgicos.

La curación de los tejidos implica una serie de procesos anabólicos que requieren un consumo calórico apropiado. Así pues, estados de malnutrición, déficit proteico o estados catabólicos avanzados interfieren en una evolución adecuada. El déficit de vitaminas y minerales ocasiona problemas que se traducen en evoluciones tisulares tórpidas: el déficit de ácido ascórbico (vitamina C), ácido retinoico (vitamina A) y piridoxina (vitamina B6), afectan la síntesis de colágeno; la carencia de tiamina (vitamina B1) interfiere con los procesos de inflamación; la maduración del colágeno es inapropiada en situaciones carenciales de riboflavina (vitamina B2); incluso la epitelización se ve afectada en casos de déficit de zinc.

Los cambios metabólicos tras la elevación del colgajo son especialmente complejos en los segmentos distales. Los tejidos isquémicos sufren una transformación a metabolismo anaeróbico con una rápida depleción de los niveles de oxígeno, glucosa y ATP, unido al aumento de los niveles de dióxido de carbono y ácido láctico. El consumo

de glucosa y glucógeno se incrementa en los segmentos viables aunque isquémicos, de forma proporcional a su grado de isquemia. El máximo consumo de la glucosa se alcanza al tercer día, para regresar a la normalidad al séptimo^{9,41,42}.

1.5. INCREMENTO DE LA VIABILIDAD DEL COLGAJO

Los factores más importantes para optimizar la viabilidad de los colgajos son el apropiado diseño y selección del mismo, la preparación adecuada del área receptora, la cuidadosa disección intraoperatoria, y una monitorización y manejo adecuados tras la intervención quirúrgica. En ocasiones, un punto de sutura mal ejecutado, restos de material quirúrgico u otros problemas considerados menores, pueden provocar una evolución tórpida. También son claves los cuidados durante el postoperatorio, por ello las maniobras encaminadas a solucionar problemas mecánicos deben instaurarse de forma precoz. Errores en estos aspectos no son subsanables mediante medicamentos o maniobras posteriores.

Un método comúnmente empleado para incrementar la viabilidad del colgajo es la disección en dos tiempos (colgajo diferido). Esto implica una elevación parcial del colgajo en un primer tiempo quirúrgico, para mejorar la perfusión distal del mismo (inicialmente isquémica), y así conseguir una supervivencia mayor de estos segmentos distales tras su disección completa en el segundo tiempo quirúrgico. Esto se debe tanto a cambios anatómicos en la microvascularización del colgajo (reorientación e incremento del tamaño vascular^{10,43}) como a factores fisiológicos a nivel celular (de acción más

rápida). Para que este procedimiento sea efectivo, se debe dividir el pedículo principal axial del colgajo^{11,44}. Todo ello sugiere que la inducción de una condición parcial de isquemia, proporciona un papel protector en posteriores situaciones de isquemia.

Hay numerosos factores metabólicos que deben ser valorados antes de cualquier procedimiento para optimizar la fisiología de los colgajos, además de un control adecuado de la tensión arterial y la temperatura del paciente, y el conocimiento exhaustivo de los tratamientos farmacológicos que recibe antes de la intervención. En ocasiones donde las características hemodinámicas sistémicas se encuentran comprometidas, como es la sepsis, o cuando los pacientes consumen medicamentos vasoconstrictores (como la nicotina) u otras drogas (particularmente la cocaína), una intervención quirúrgica programada debería posponerse hasta corregir estas situaciones. En el caso del tabaco^{12,45,46}, el vasoespasmo que ocasiona podría desencadenar una trombosis con la pérdida completa del colgajo, por lo que se debe recomendar a los pacientes no fumar durante varias semanas de forma previa a la cirugía^{13,47}.

La temperatura puede tener un efecto relevante en la perfusión a nivel de la microcirculación, la tolerancia del colgajo a la isquemia, y la severidad de la lesión durante la reperfusión. La hipotermia implicaría vasoconstricción con una disminución de la perfusión tisular, pero tiene un efecto protector frente al efecto lesivo del SIR (reducción en el acúmulo neutrofílico y del daño tisular mediado por éstos^{14,48}).

Numerosos agentes farmacológicos han sido relacionados con un incremento de la perfusión de los colgajos y de su supervivencia.

Los esteroides basan su eficacia en sus propiedades de estabilizador de membrana y de antiinflamatorio inespecífico^{15,16,49-51}. Sin embargo, los riesgos de infección que provocan, parecen sobrepasar sus beneficios potenciales.

Los fármacos más usualmente empleados son los agentes reológicos y anticoagulantes. El dextrano^{17,18,52,53} descende los niveles de adherencia plaquetaria, inhibe su agregación y descende la viscosidad sanguínea, aunque se contraindica en paciente añosos, y se debe hacer un test de tolerancia previo debido a las posibles reacciones anafilácticas. La aspirina⁶⁷ (ácido acetil salicílico) bloquea la agregación plaquetaria, inhibiendo la cicloxigenasa derivada de plaquetas, y así limitando la producción del tromboxano (potente vasoconstrictor e impulsor de la agregación plaquetaria), y a dosis más altas inhibe la cicloxigenasa endotelial, produciendo prostaciclina (vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria). La aspirina no posee efectos reológicos, así que su efecto beneficioso primario es antitrombótico (su empleo no estaría justificado en los casos de pretender incrementar la perfusión distal del colgajo).

La heparina realiza su efecto antitrombótico debido a su unión a la antitrombina III, que inactiva entonces a factores como la trombina^{3,54}. Su empleo sistémico se limita a la cirugía microvascular debido a los hematomas clínicamente relevantes que se producen. Su uso tópico en microcirugía está globalmente aceptado, pese a que las series prospectivas más largas han demostrado que no ofrece beneficios significativos^{19-22,55}.

Las sangrías han demostrado su papel beneficioso en el tratamiento de las complicaciones de los colgajos^{23,56,57}. Se emplean para limitar la congestión venosa,

proporcionado numerosos efectos positivos. Las conocidas como *Hirudo Medicinalis* poseen efecto vasodilatador y descomprimen el colgajo a través del sangrado que provocan, inyectan hirudina (potente inhibidor de la conversión de fibrina en fibrinógeno que no requiere la presencia de antitrombina III) e hialuronidasa (que ayuda a la diseminación de la hirudina en los tejidos). Los riesgos más significativos son el sangrado excesivo y la infección por *Aeromona hydrophila*.

En resumen, existen multitud de terapias pensadas para incrementar la viabilidad del colgajo, aunque aún no existe un sustituto a un correcto diseño y ejecución técnica del colgajo.

2. Síndrome por isquemia reperusión

2.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTOS RELACIONADOS

La isquemia es una situación de inadecuado flujo sanguíneo en un área de tejido determinado, dando lugar a un aporte insuficiente de oxígeno y nutrientes que instaura un metabolismo anaerobio. En el caso en el que el período de isquemia excediera la tolerancia del tejido, se desarrollaría un proceso inflamatorio que podría provocar la muerte del mismo^{24-28,40,58}. La reperusión consiste en el restablecimiento del flujo sanguíneo en un tejido tras un período de isquemia, permitiendo la llegada de mediadores de la inflamación que originan un daño tisular añadido. Al conjunto de fenómenos fisiopatológicos que ocurren durante el período de isquemia y su posterior reperusión se denomina síndrome por isquemia reperusión (IR).

Son numerosos los escenarios clínicos en los que el síndrome por IR se pone de manifiesto, como los trasplantes de órganos sólidos y los casos de infarto agudo de miocardio, isquemia mesentérica o accidentes vasculares cerebrales que llegan a reperfundirse.

En el ámbito de la cirugía plástica, el síndrome por IR adquiere relevancia en casos de reimplantes tras amputaciones traumáticas, en la transferencia de tejidos a distancia mediante técnicas microquirúrgicas (los llamados colgajos libres) y en alotrasplantes de tejidos compuestos (como en el trasplante de manos o de cara). En estos casos, el período de isquemia se inicia tras la sección del pedículo vascular;

posteriormente, con la ejecución de las anastomosis vasculares, se da paso a una serie de fenómenos asociados a la perfusión del colgajo.

Como ya hemos comentado, los distintos tejidos presentan una tolerancia determinada a la isquemia. La piel y el hueso presentan una mayor tolerancia a la isquemia que el músculo esquelético, explicado en parte por su mayor metabolismo basal^{29,59}. Una forma de definir esta característica es mediante: (1) el tiempo crítico de isquemia o tiempo máximo que un tejido puede tolerar isquemia completa y permanecer viable, y (2) el tiempo crítico de isquemia medio o tiempo de isquemia necesario para causar la pérdida del 50% del colgajo^{30-32,60}.

Es conveniente definir dos términos muy usados en la bibliografía en relación con el síndrome por IR: isquemia primaria e isquemia secundaria.

La isquemia primaria hace referencia al primer período de ausencia de flujo sanguíneo que comienza con la sección del pedículo vascular del colgajo y termina con la liberación de los clamps tras la anastomosis vascular en su zona receptora. Comenzaría entonces el período de perfusión del colgajo. Si la disección del colgajo y el período de isquemia primaria han sido adecuados, el restablecimiento del flujo sanguíneo contrarresta los cambios fisiológicos desfavorables propios de la isquemia primaria. Por el contrario, en el caso de disección incorrecta o isquemia primaria prolongada, la perfusión conlleva un proceso inflamatorio que puede dar lugar a la pérdida del colgajo.

En aquellos casos en que el flujo sanguíneo es interrumpido por segunda vez tras una reperusión óptima hablamos de isquemia secundaria. Este segundo período de isquemia es mucho más dañino para el colgajo que el inicial o isquemia primaria⁶¹.

La causa más frecuente de isquemia secundaria lo constituye la trombosis a nivel de la anastomosis vascular como consecuencia de una técnica microquirúrgica deficiente. Otras posibles causas son la mala calidad de los vasos, patologías preexistentes en ellos (como la aterosclerosis) o factores sistémicos (hipotensión o hipercoagulabilidad)^{40,62}. Puede ser también una consecuencia de una compresión mecánica externa, ya sea por torsión del pedículo vascular, hematoma, cierre a tensión de los tejidos periféricos o compresión por el efecto de un drenaje⁴⁰. Otros factores que han demostrado su relevancia en el fracaso de la microanastomosis son la disección linfática previa y el tratamiento con radioterapia preoperatoria⁶³.

2.2. MECANISMOS DEL SÍNDROME POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN

La ausencia de flujo sanguíneo que acontece durante el período de isquemia genera un déficit de oxígeno y nutrientes. Con la disminución de oxígeno tisular el metabolismo celular cambia de aeróbico a anaeróbico. En presencia de un metabolismo anaerobio, se acumula el lactato, disminuye el pH y la disponibilidad de ATP que dan energía a las bombas iónicas descende. En consecuencia, el transporte a través de las membranas celulares se ve alterado, concentrándose los metabolitos celulares. El calcio intracelular se eleva y los mediadores proinflamatorios se acumulan dando lugar en

última instancia a RLO que son los principales mediadores del daño tisular^{40,64,65} (figura 1).

La gravedad del daño tisular producido por una isquemia primaria está directamente relacionada con el tiempo de isquemia⁶⁶. Por otra parte, los tejidos con mayor tasa metabólica son más susceptibles a un tiempo determinado de isquemia que aquellos con un metabolismo más lento. Por ejemplo, el músculo es un tejido más sensible a la isquemia que la piel o el hueso. En el caso de colgajo compuestos, los distintos componentes tisulares tendrán diferente tolerancia a un período de isquemia determinado (en un colgajo miocutáneo una isquemia prolongada puede dar lugar a una paleta cutánea viable y a un segmento muscular no viable)⁵⁹.

El restablecimiento del flujo sanguíneo o reperfusión del colgajo inicia una cascada de eventos que puede resultar paradójicamente en un daño tisular añadido al generado por la isquemia primaria. Que la reperfusión de un tejido resulte en el restablecimiento del metabolismo celular normal o en daño por IR dependerá del daño ocasionado durante la isquemia primaria. Éste último está influenciado por distintas variables como son el tipo de tejido, la temperatura, el tiempo de isquemia, la presión de perfusión, el tratamiento farmacológico o el preconditionamiento isquémico⁶⁷.

El daño por reperfusión es un proceso inflamatorio mediado principalmente por neutrófilos. La reperfusión permite que neutrófilos, plaquetas y otras células inflamatorias del sistema circulatorio se acumulen en el colgajo en respuesta a las señales quimiotácticas originadas en el período de isquemia primaria. Los neutrófilos, a través de la producción de RLO fundamentalmente, ocasionan edema intersticial, aumentan la

permeabilidad capilar e inducen una vasoconstricción que desembocará en la trombosis vascular y la necrosis tisular (figura 1). Además, se produce una pérdida del control adrenérgico sobre el tono vascular y una disminución en la producción de agentes vasodilatadores como el óxido nítrico por parte de las células endoteliales, contribuyendo al daño microvascular.

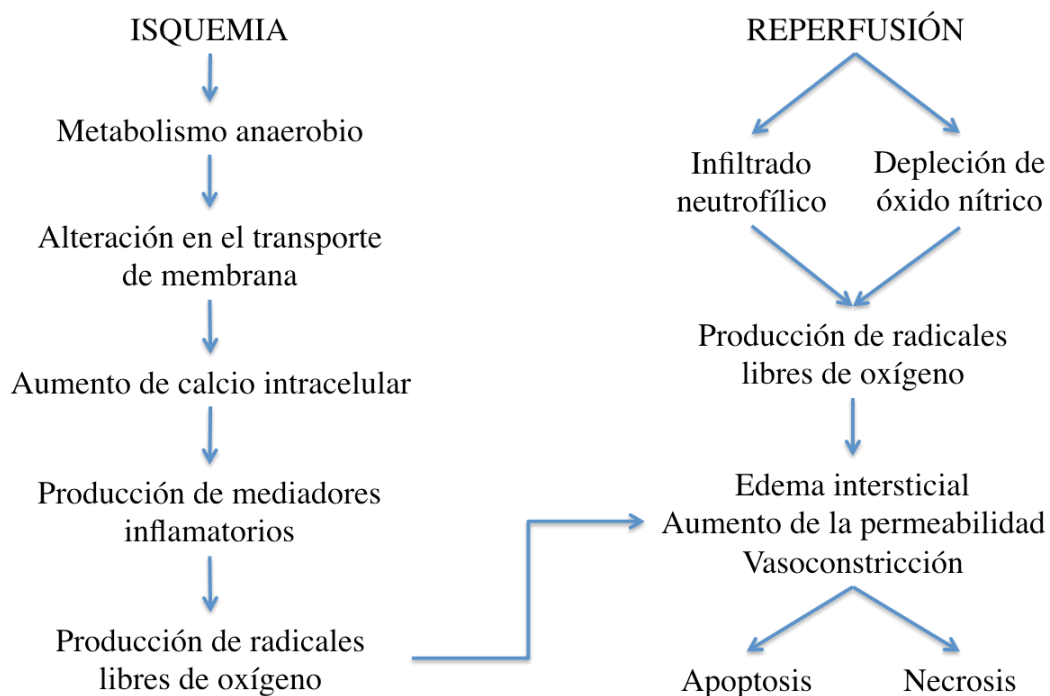


Figura 1. Esquema de la fisiopatología del síndrome por IR.

2. 2. 1. Radicales libres de oxígeno

Los RLO formados como consecuencia del SIR producen una serie de cambios que afectan a la microcirculación, ocasionando el edema de las células endoteliales, una

vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad capilar. Estos RLO pueden provocar efectos citotóxicos directos, pero probablemente más importante es el hecho de ser desencadenantes de la inflamación local aguda, la adherencia y la acumulación leucocitaria, y el consecuente daño endotelial, con los siguientes sucesos celulares que acarrearán el colapso de la microvascularización.

Durante la isquemia, y fundamentalmente durante la reperfusión tisular, se producen RLO que producen el daño de IR^{60,68-70}. Estos RLO se derivan de dos procesos diferentes: el sistema xantino oxidasa endotelial y el sistema nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) neutrofílico. La producción de RLO neutrofílicos durante la IR se denomina estallido respiratorio^{40,60,71}.

Durante el período de isquemia caen los niveles de energía, alterando el gradiente iónico y permitiendo la entrada de calcio al citoplasma. El calcio activa los enzimas del citosol en las células endoteliales, que transforman la xantino deshidrogenasa en xantino oxidasa durante la reoxigenación.

Mientras la xantino oxidasa está siendo generada, el ATP se degrada a AMP y finalmente a hipoxantina a medida que la célula comienza su metabolismo anaerobio. La hipoxantina es un sustrato en la generación de metabolitos de oxígeno por la xantino oxidasa. Así, la xantino oxidasa cataliza la conversión de hipoxantina (formada de la degradación de la ATP durante la isquemia) y oxígeno para formar xantina, generando un anión superóxido (figura 2). Éste puede provocar la formación de otros radicales de oxígeno y provocar directamente un daño tisular.

De esta forma, durante el período de isquemia, aparecen 2 de los 3 principales involucrados en la formación de radicales. Una vez que el oxígeno es reintroducido con la perfusión, se produce la reacción, y los radicales, primariamente el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos, son generados. La exposición del plasma a los óxidos generados o las células endoteliales a la hipoxia pueden provocar la producción de quimiotácticos neutrofílicos. A su vez, la hipoxia tisular y la perfusión promueven el secuestro neutrofílico, un efecto que es bloqueado por inhibidores de lipoxigenasa⁷² o scavengers de radicales libres⁷³.

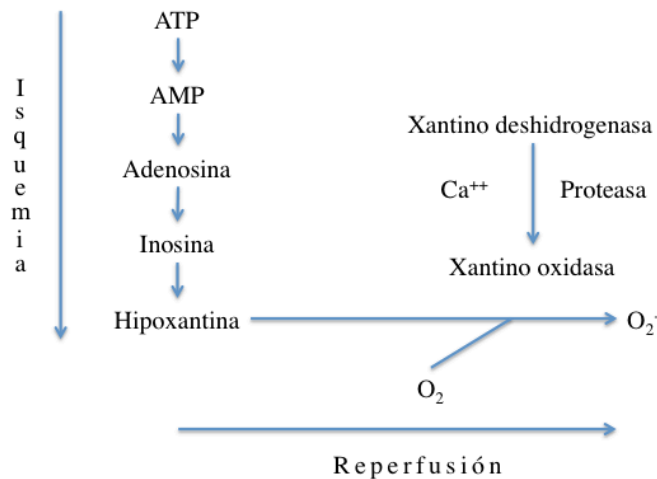


Figura 2. Producción de RLO en el síndrome por IR.

Los antioxidantes son compuestos con la capacidad de neutralizar los RLO, evitando así el daño tisular, donando electrones a los radicales libres. Algunos antioxidantes son producidos de forma endógena en el cuerpo (denominados antioxidantes endógenos, como el glutatión o GSH, ácido úrico, y las formas reducidas de las ubiquinonas o ubiquinoles) y otros se adquieren a través de la dieta (llamados así

antioxidantes exógenos, como vitamina C y E, ácidos grasos, riboflavina, carotenoides). Los antioxidantes pueden prevenir el daño tisular neutralizando los RLO^{68,74}. El incremento en la producción de RLO y/o el descenso en la defensa antioxidante pueden definirse como estrés oxidativo⁷⁵.

Durante el estrés oxidativo, se produce la sobreexpresión de antioxidantes endógenos^{76,77}. Sin embargo, durante la reperfusión, muchos RLO se desarrollan precozmente y en un corto período de tiempo, saturando el sistema antioxidante^{76,78-80}. Se produce así un rápido consumo de antioxidantes bajando su concentración^{74,76,79,81,82}. Esta caída en los niveles de antioxidantes endógenos tras la IR, sugiere que los colgajos y órganos bajo esta situación podrían beneficiarse de la terapia antioxidante. Su administración antes o durante la isquemia reperfusión tiene un efecto protector, mejorando la función orgánica, incluso a largo plazo^{74,78,79,81,83}.

Numerosos antioxidantes han demostrado su eficacia en la prevención y tratamiento del síndrome por IR, mejorando la supervivencia de los colgajos cutáneos^{69,84}.

El glutatión, uno de los antioxidantes más importantes, disminuye sus niveles tras la IR en los colgajos cutáneos en los animales⁷⁵. La inhibición de su producción endógena durante la IR, provocaría un incremento del daño tisular, y su administración antes de la misma lo disminuiría⁷⁸.

Otros antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), el dimetilsulfóxido (DMSO) y las vitaminas C y E, se han empleado de forma experimental para disminuir el daño tisular⁸⁵. La administración de SOD incrementa la supervivencia de los colgajos⁸⁶⁻⁸⁸.

El tratamiento con DMSO previo a la isquemia incrementaría la viabilidad de los colgajos fasciocutáneos⁸⁹, un efecto similar al obtenido mediante el tratamiento con vitamina C (ácido ascórbico)^{57,62,90}. El éster fenetílico de ácido cafeíco (CAPE) ha demostrado su capacidad antioxidante y antiinflamatoria incrementando la supervivencia de los colgajos cutáneos en animales.

2. 2. 2. Neutrófilos

El segundo aspecto relevante del daño de IR es la aferencia masiva de neutrófilos durante la reperfusión^{69,84,85,91}. Éstos forman parte de la respuesta local inflamatoria, y producen RLO a través del sistema NADPH oxidasa^{40,60,84,88,92,93}. Así, la inhibición del infiltrado neutrofílico (por ejemplo mediante el empleo de fármacos inmunosupresores) reducirá la acumulación de RLO, atenuando así el daño por el síndrome de IR^{84,85,94}.

Un alto porcentaje del daño tisular por la isquemia se debe a los sucesos que acontecen durante la reperfusión. En estas condiciones, existe una estrecha relación entre el acúmulo de polimorfonucleares (PMN) y el daño tisular, evidenciándose un menor sufrimiento de los tejidos mediante la depleción de los PMN⁹⁵.

La infiltración neutrofílica que sigue a un período de isquemia en los colgajos cutáneos se demuestra empleando diferentes modelos^{84,85}, como el basado en la mieloperoxidasa, empleada como marcador enzimático en el recuento de la infiltración leucocitaria⁸⁵. La mieloperoxidasa es la proteína más abundante en los neutrófilos, y es la única peroxidasa que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno y cloruro a ácido

hipocloroso (potente agente oxidante). Los colgajos con signos de necrosis muestran una actividad de mieloperoxidasa mayor que los colgajos sin estos signos⁹².

Se describen diversos mecanismos a través de los cuales los PMN activados causarían una lesión tisular en el contexto de la isquemia reperusión. El daño endotelial directo que producen, induce la pérdida de la integridad vascular, con el posterior edema y hemorragia, con el resultado final de trombosis vascular. Otro mecanismo lo condiciona la propia adherencia leucocitaria y el daño que provocaría el acúmulo de éstos en la luz vascular, su oclusión y posterior isquemia.

El proceso de la extravasación leucocitaria se divide en tres pasos: rodamiento, adhesión y trans migración. El rodamiento disminuye la velocidad del leucocito y estimula el contacto endotelial. Los leucocitos se adhieren a continuación firmemente al endotelio, para terminar finalmente su migración tisular.

La adhesión endotelial de los PMN desempeña un papel central⁹⁶⁻⁹⁹ en la lesión tisular mediada por leucocitos. En el foco inflamatorio, los PMN abandonan el flujo sanguíneo laminar, adhiriéndose con firmeza al endotelio. En este nivel se producen a continuación los procesos de diapédesis y migración. Una vez que los PMN se adhieren con fuerza a las células endoteliales endoluminales, se crea un microambiente donde se desarrollan las proteasas y los oxidantes responsables del daño endotelial, siendo estos productos inaccesibles a los agentes antiinflamatorios y antioxidantes¹⁰⁰. Los PMN podrían entonces migrar entre las células endoteliales a los tejidos periféricos.

Las moléculas responsables de esta adhesión se pueden clasificar en dos grandes categorías, las integrinas leucocitarias y sus ligandos endoteliales (miembros de la familia de inmunoglobulinas), y las selectinas y sus contraestructuras de carbohidratos:

- Integrinas y sus ligandos de las células endoteliales (familia de inmunoglobulinas): el complejo glicoproteico de membrana leucocitaria CD11/CD18 condiciona la adherencia endotelial tras la estimulación de los PMN. En situaciones basales, sin estimulación coexistente, los neutrófilos exhiben un bajo nivel de adherencia endotelial. El heterodímero más relevante es el CD11b/CD18 (Mac-1, Mo1, CR3)¹⁰¹, que se encuentra tanto en la superficie celular como en los depósitos intracelulares. Estos depósitos se expresan de forma más relevante en la superficie celular tras un estímulo determinado; sin embargo esta expresión por sí misma no es suficiente para condicionar la adhesividad celular. El mecanismo primario sería la activación de los receptores de superficie, que se unen a las moléculas de adhesión intercelulares endoteliales (ICAMs: moléculas de adhesión intercelulares 1; CD54). Estas moléculas ICAM-1 se expresan también en respuesta a estímulos inflamatorios¹⁰². Tanto los anticuerpos monoclonales frente a CD11b como CD18, y en menor medida los anticuerpos frente ICAM-1, han demostrado su eficacia en la inhibición de la adherencia endotelial leucocitaria.
- Selectinas: desempeñan un significativo papel en las fases iniciales de la adhesión de los PMN al endotelio (rodamiento). Los tres receptores de selectinas serían la E-selectina (CD62E; ELAM-1) que se expresa en las células endoteliales, la P-selectina (CD62P; GMP-140, PADGEM, o CD62) que se expresa en las células endoteliales y las plaquetas, y la L-selectina (CD62L; LAM-1, Leu-8, o LECAM-1) se expresaría únicamente en la membrana leucocitaria¹⁰³. La unión tiene lugar

entre la selectina dominante y su contraestructura específica localizada bien en la membrana leucocitaria o en la endotelial. La P-selectina se expresa mínimamente en condiciones basales sin estimulación endotelial asociada. Esta selectina media un enlentecimiento de los PMN en los lugares de inflamación. La L-selectina se expresa continuamente en la superficie leucocitaria en situación basal. La E-selectina alcanza en cambio su pico de expresión a las 4 ó 6 horas de la estimulación.

Fisiológicamente, la interacción leucocitaria endotelial es de carácter mínimo. Tras un estímulo inflamatorio (por ejemplo la isquemia reperusión) existe una rápida inducción de la acción de las selectinas¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ y con ello se inicia el proceso de rodamiento. Los factores liberados en el proceso inflamatorio tales como la trombina, la histamina y diversos oxidantes, puede iniciar la expresión de P-Selectinas. Las citoquinas más tarde generadas (interleuquinas-1 y factor de necrosis tumoral α), pueden inducir las L-Selectinas y las E-Selectinas. El rodamiento inicial leucocitario que generan, permite a los PMN un contacto directo con el endotelio vascular, con la consiguiente activación de los receptores de integrinas.

Diversos mediadores lipídicos, como el factor de activación plaquetario (PAF), péptidos quimiotácticos como el C5a, y otros como la interleuquina 8, juegan un relevante papel en la adhesión integrinas/ICAM-1. PAF es expresado en la superficie endotelial en respuesta a la trombina, histamina o agentes oxidantes.

En el desarrollo de la IR, los RLO se generan en el momento de la reperusión^{107,108}. Estos radicales incrementan rápidamente el proceso de adhesión

leucocitaria, fomentando la expresión de P-Selectinas, la liberación del PAF, con la consecuente adhesión mediada por integrinas¹⁰⁹. La producción de RLO contribuye a la quimiotaxis y la activación de las moléculas de adhesión que encabezan la infiltración neutrofílica⁸⁵.

2. 2. 3. Óxido Nítrico

El tercer mecanismo relevante del síndrome por IR es la depleción del óxido nítrico. La L-arginina es un aminoácido con efectos inmunoestimulantes que promueve una adecuada evolución tisular¹¹⁰. Es, además, un precursor del óxido nítrico (NO). En las células endoteliales y en las neuronas, la L-arginina se convierte en NO por la enzima NO-Sintetasa (NOS).

El NO juega un papel tanto lesivo como protector en el síndrome por IR¹¹¹⁻¹¹³; puede agravar la lesión por la IR^{114,115}, pero puede observarse su efecto protector de los tejidos afectados por él, a través de la regulación del tono vascular, la inhibición de la agregación y adhesión trombocitaria, la inhibición de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular, su efecto como scavenger de los RLO, su papel en el mantenimiento de la permeabilidad vascular normal, la inhibición de la proliferación del tejido muscular liso, el fortalecimiento inmunológico y la regeneración de las células endoteliales^{60,113-116}.

Estos efectos contradictorios podrían resultar de la expresión de las diferentes isoformas de la NOS^{114,115}, NOS constitutiva (cNOS) y NOS inducible (iNOS)¹¹⁶:

- La cNOS posee un efecto protector a través de la inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria y leucocitaria¹¹⁷. Sin embargo, al inicio de la isquemia, cNOS produce altas concentraciones de NO, provocando una depleción de su precursor L-arginina¹¹⁸. A consecuencia de esta baja concentración de L-arginina, el NO no podría ser producido por el endotelio¹¹⁹, y los RLO son producidos en lugar del NO. Estos pueden representar hasta el 70% de los RLO producidos durante la reperusión¹¹⁸.
- La iNOS parece contribuir al desarrollo de la lesión por el síndrome por IR, produciendo una reacción con los RLO para formar peroxinitritos^{110,114,117}, que provocaría la peroxidación de la grasa y produciendo un daño adicional¹¹⁵. La inhibición de la iNOS neutralizaría el daño y la necrosis de los tejidos^{114,117}.

El descenso en la concentración de NO provoca vasoconstricción y microtrombosis¹¹⁰. La administración de L-arginina puede ser beneficiosa en el mantenimiento de los niveles de cNOS, incrementando así la viabilidad del colgajo^{116,117}. Debido a que el NO se trata de un gas lábil, es difícil su administración directa. Por ello se emplea principalmente su precursor¹²⁰ L-arginina. No obstante, hay diversos estudios a nivel experimental que describen el efecto beneficioso de la administración de NO exógeno vía intraarterial e inhalada en modelos de síndrome por IR¹²¹⁻¹²⁴.

2. 2. 4. Complemento

El sistema del complemento es un grupo de más de 30 proteínas plasmáticas y de membrana implicadas en el sistema de defensa inmunológico innato y uno de los principales mecanismos efectores subyacentes en la inmunidad mediada por anticuerpos. El sistema del complemento puede ser activado mediante tres mecanismos diferentes: la vía clásica (activada por IgG e IgM), la vía de las lecitinas (activadas por moléculas bacterianas) y la vía alternativa. Otras sustancias como las citoquinas, proteínas intracelulares, radicales libres o la proteína C reactiva (PCR) pueden activar la cascada de reacciones químicas que componen el sistema del complemento¹²⁵.

Las tres vías del complemento (clásica, de las lecitinas y alternativa) convergen en la activación de anafilotoxinas (C3a y C5a) y del complejo de ataque de membrana (C5a y C5b-C9), los auténticos mediadores del daño celular (figura 3). Sus mecanismos de activación son¹²⁶:

- La vía clásica se inicia con la asociación del complejo C1 (que consiste en C1q, dos moléculas de C1r y dos moléculas de C1s) a anticuerpos unidos a antígenos de la superficie celular bacteriana. En primer lugar C1s divide a C4, que se une covalentemente a la superficie bacteriana para posteriormente dividir C2 permitiendo la formación del complejo C4b2a, la C3 convertasa de la vía clásica. Esta C3 convertasa inicia la cascada final y común del sistema de complemento que permite la activación de las anafilotoxinas C3a y C5a y del complejo de ataque de membrana.
- La vía de las lecitinas puede considerarse una variante de la vía clásica con la peculiaridad de no requerir la presencia de anticuerpos para su activación. Se

activa por medio de la proteína MBP (mannose-binding lectin), que detecta y se une a los residuos de manosa presentes en la pared bacteriana. A continuación se une y activa a las proteasas plasmáticas MASP1 y MASP2 (mannose-binding lectin-associated proteases 1 y 2, respectivamente). MASP2 actúa de manera similar a C1s en la vía clásica que determinará la formación de C4b2a, la C3 convertasa de la vía clásica. MASP1 puede llegar a activar a C3 directamente. A partir de este punto la cascada de reacciones químicas es común a la de la vía clásica.

- La vía alternativa se considera una vía más primitiva. Su activación no es iniciada por inmunoglobulinas sino por lipopolisacáridos bacterianos directamente. Esta vía constituye un estado de activación permanente de C3 que genera C3b. La cascada se inicia con la unión de C3b a grupos hidroxilo de los carbohidratos y proteínas de membrana. C3b se une al factor B (proteína del sistema del complemento homóloga a C2) para formar el complejo C3bB. A continuación el factor D divide el factor B del complejo para formar C3bBb, que constituye la C3 convertasa de la vía alternativa. En este punto se llega a la vía final y común de la activación del complemento.

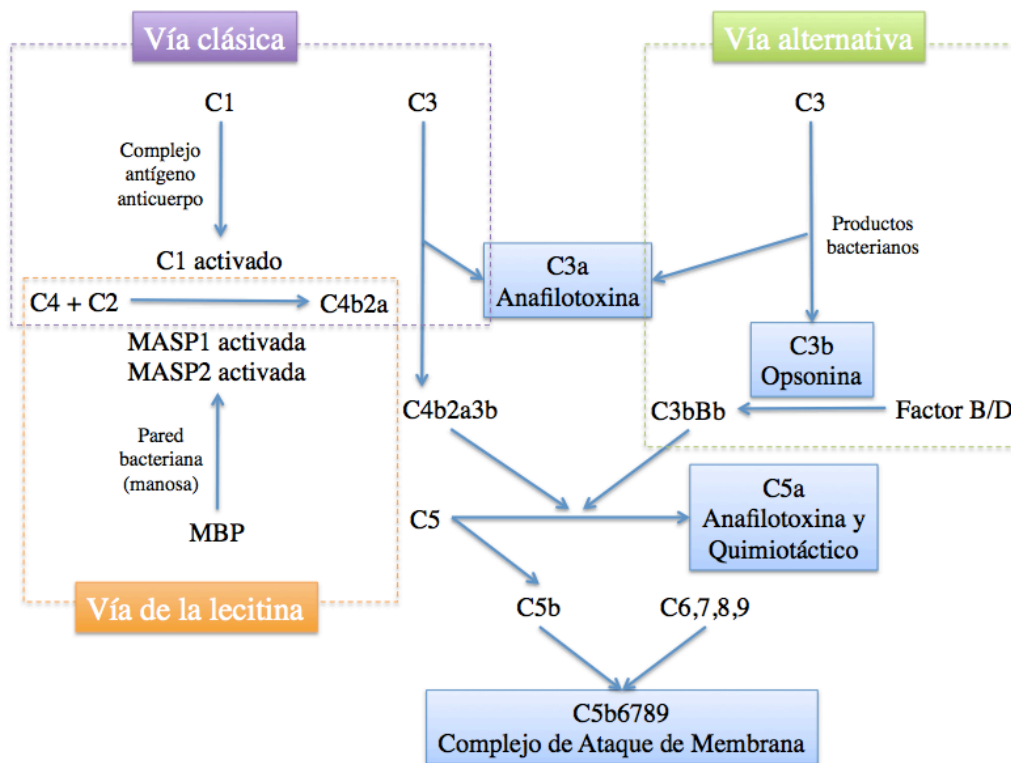


Figura 3. Esquema del sistema del complemento: vías clásica, de la lecitina y alternativa.

La activación de las vías clásica, de las lecitinas y alternativa del sistema del complemento y la formación de las anafilotoxinas C3a y C5a determina el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, producción de RLO, sobreexpresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial y plaquetaria, y la liberación de citoquinas¹²⁵. A nivel fisiopatológico estos cambios suponen en el colgajo una activación neutrofílica, vasoconstricción arterial, alteración de la microcirculación, aumento de la permeabilidad vascular y lisis celular; en definitiva, una importante respuesta inflamatoria¹²⁷.

La importancia del sistema del complemento en el daño por IR fue propuesto hace más de cuatro décadas. Se reveló la presencia de depósitos de complemento en biopsias

cardiacas tras infarto de miocardio, a menudo combinados con proteína C reactiva (PCR)¹²⁸. Desde el establecimiento del papel de complemento en el daño por IR, éste ha constituido una importante diana terapéutica en numerosos estudios experimentales y algunos ensayos clínicos.

A nivel experimental, son numerosos los estudios que han descrito el papel del complemento en el síndrome por IR. Uno de los factores estudiados es el receptor recombinante soluble del complemento tipo 1 (sCR 1) que ha demostrado beneficios en modelos de IR en infarto de miocardio e infarto cerebral¹²⁹⁻¹³². Otros estudios han valorado el efecto de la antagonización de los factores de complemento C1s¹³³, C3a^{134,135}, C5a^{136,137} y su receptor (C5r)¹³⁸ en modelos animales de infarto de miocardio, en trasplante renal, en infarto cerebral e isquemia mesentérica, con similares resultados. También está ampliamente estudiado en efecto beneficioso del inhibidor de la C1 esterasa (C1-INH) en modelos experimentales de las patologías ya mencionadas¹³⁹⁻¹⁴¹. En cambio no aparecen en la literatura referencias al posible efecto beneficioso de esta sustancia en la transferencia de colgajos libres.

En experimentación clínica aún queda mucho por estudiar en este campo. No obstante en los últimos quince años se han publicado algunos resultados de ensayos clínicos sobre el efecto de la inhibición del complemento en el síndrome por IR, principalmente en el campo de la isquemia miocárdica pero también en casos de hemoglobinuria paroxística nocturna y de trasplante pulmonar. Las sustancias terapéuticas ensayadas hasta ahora en humanos son anticuerpos frente a C5 (Eculizumab, Pexelizumab)¹⁴²⁻¹⁴⁵, el receptor recombinante soluble del complemento tipo 1 (sCR1)^{146,147} y C1-INH¹⁴⁸⁻¹⁵⁰

2.3. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN EN COLGAJOS

Son numerosas las intervenciones terapéuticas recomendadas para aumentar la viabilidad de los colgajos revascularizados mediante técnicas microquirúrgicas. Entre los factores más importantes a controlar encontramos la insuficiencia producida a nivel vascular y el síndrome por IR¹⁵¹.

A nivel farmacológico Rohrich¹⁵² definió las características ideales del medicamento a emplear para aumentar la supervivencia de los colgajos: disponibilidad clínica, fácil administración, alta seguridad terapéutica, coste efectividad, de resultados reproducibles, conocer su mecanismo de acción y su biodisponibilidad, viabilidad del tratamiento en el postoperatorio, además del efecto protector frente a la necrosis del colgajo.

A continuación, intentaremos desarrollar los aspectos más relevantes del tratamiento del daño por IR aplicado a la transferencia de colgajos libres.

2.3.1. Preacondicionamiento isquémico

El preacondicionamiento isquémico es una técnica que permite aumentar la tolerancia del tejido a la isquemia mediante la aplicación de breves períodos de isquemia seguidos de períodos de reperfusión previos a una isquemia primaria definitiva y más prolongada. Este fenómeno fue descrito por primera vez en el 1986 por Murray en tejido

cardíaco¹⁵³. Posteriormente numerosos estudios experimentales han demostrado el mismo efecto en otros órganos (como hígado^{35,154} y riñón^{36,155}) y en colgajos^{37-39,156-160}.

A pesar de los ensayos clínicos que han demostrado resultados favorables en el campo de la cirugía cardíaca, hepática y pulmonar, faltan estudios clínicos multicéntricos que verifiquen la eficacia de este tipo de intervenciones en tejido cutáneo y muscular humano¹⁶¹.

2. 3. 2. Antioxidantes

Anteriormente hemos descrito el importante papel de los RLO en el daño por IR de los tejidos. Las sustancias neutralizantes de RLO ejercen su papel antioxidante mediante la reducción de las especies de oxígeno a productos comunes y relativamente inocuos⁶⁷.

Para neutralizar los RLO, numerosos compuestos antioxidantes han sido investigados como son la coenzima Q10¹⁶², el ácido fenetil éster cafeíco (CAPE)¹⁶³, la superóxido dismutasa¹⁶⁴, el taurine¹⁶⁵, el aspartato de zinc¹⁶⁶, la melatonina¹⁶⁷⁻¹⁶⁹, entre otros. La mayoría de estos antioxidantes han demostrado resultados positivos en la reducción del tejido necrótico, de las alteraciones microcirculatorias, de la producción de superóxido, de la disfunción mitocondrial y metabólica, del daño histológico, de la mieloperoxidasa, y de la actividad de la creatina fosfoquinasa plasmática en el músculo estriado o en piel¹⁶¹. A pesar de todos los avances descritos en la bibliografía, no existe un

antioxidante o combinación de ellos que haya demostrada de manera consistente una reducción significativa del daño por IR de los tejidos.

2. 3. 3. Anticoagulantes y antiagregantes

El uso de anticoagulantes está muy extendido en el campo de la cirugía de los colgajos libres. Se administra tanto a nivel sistémico como en soluciones tópicas en el lugar de la anastomosis. La finalidad terapéutica del uso de anticoagulantes es la prevención de trombosis.

La heparina sistémica ha demostrado una disminución en la cantidad de émbolos plaquetarios enviados a nivel distal desde la zona de microanastomosis vascular¹⁷⁰. A nivel distal estas plaquetas ejercerían su efecto deletéreo en el colgajo a través de la secreción de sustancias vasoactivas y quimiotácticas, por lo que su disminución resultaría beneficiosa. No obstante, hay estudios en los que el uso de infusión sistémica de heparina no reporta beneficios en la supervivencia del colgajo^{171,172}. En su uso tópico, la heparina ha resultado efectiva en la disminución de trombosis y mejora de la permeabilidad a nivel de la microanastomosis¹⁷³. Otras sustancias anticoagulantes como el dextrano han sido investigados con buenos resultados en cuanto a permeabilidad y disminución de la incidencia de trombosis⁵², pero su uso a nivel clínico no está muy extendido.

Entre los antiagregantes cabe destacar dos compuestos. La aspirina (ácido acetil salicílico)^{174,175} se ha empleado en numerosos modelos experimentales en colgajos cutáneos en ratas. Se ha constatado que su administración a altas dosis (200mg/kg)

incrementa la supervivencia del colgajo, aparentemente modificando la reacción inflamatoria (donde encuentra su protagonismo el síndrome por IR), y no a través de su efecto antiagregante plaquetario. El clopidogrel¹⁷⁶ también se ha mostrado eficaz en la prevención de la isquemia tisular de los colgajos cutáneos.

2. 3. 4. Trombolíticos

Los agentes trombolíticos actúan estimulando al plasminógeno directa o indirectamente. El plasminógeno a su vez, es precursor de la plasmina que actúa degradando las moléculas de fibrina del trombo.

La estreptoquinasa es un trombolítico de primera generación que se extrae de los estreptococos. Se utiliza en casos de salvamento de colgajos que sufren una isquemia secundaria por trombosis. En estos casos, se utiliza mediante infusión del mismo por el vaso arterial del colgajo y dejando que drene espontáneamente por la vena correspondiente. Su principal desventaja es la posibilidad de reacción alérgica dado su origen bacteriológico. Otros compuestos como la uroquinasa, también de primera generación, o el activador del plasminógeno, de segunda generación, presenta una acción similar a la estreptoquinasa obviando el riesgo alérgico⁶⁷.

2. 3. 5. Nitritos

Los nitritos se pueden considerar como una importante reserva de óxido nítrico en sangre. Ante condiciones de hipoxia y disminución del pH los nitritos se transforman en

óxido nítrico mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos. El período de isquemia da lugar a unas condiciones de hipoxia y acidez generando el ambiente adecuado para la bioconversión de los nitritos a su forma activa, el óxido nítrico.

A pesar de que el papel del óxido nítrico en el daño por IR de los colgajos está ampliamente refrendado en la bibliografía en estudios experimentales^{122,177}, a nivel clínico, su utilización suele estar en relación con isquemia miocárdica y no así en la cirugía reconstructiva con colgajos libres

2. 3. 6. Oxígeno hiperbárico

Algunos estudios clínicos han documentado un aumento significativo de la supervivencia en reimplante de miembros, en transferencia de colgajos libres y tras lesiones por aplastamiento con el uso de oxígeno hiperbárico (O₂HB)^{178,179}. A pesar de ello, la cantidad de información disponible es insuficiente para establecer la eficacia de la terapia con O₂HB basado en la evidencia científica. Los protocolos de tratamiento utilizados para el síndrome por IR utilizan el O₂HB durante los primeros días tras la reperfusión con presiones parciales de oxígeno de 2,5-3 atmósferas absolutas, y en ocasiones varias veces al día¹⁸⁰.

El efecto terapéutico del O₂HB en el daño por IR se explica por varios mecanismos. Por una parte, tras la reperfusión, comienza la adhesión al endotelio por parte de los neutrófilos mediado por las β_2 -integrinas. Se ha demostrado que con la exposición de humanos y animales a terapia de O₂HB a 2.8-3 atmósferas absolutas

durante un mínimo de 45 minutos, la adherencia de los neutrófilos al endotelio se ve temporalmente inhibida¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Resulta interesante destacar que el O₂HB no disminuye la viabilidad de los neutrófilos ni afecta a sus funciones de desgranulación, fagocitosis o capacidad de generar estrés oxidativo ante señales quimiotácticas. La importante consecuencia es la ausencia de inmunosupresión en la terapia con O₂HB, prueba de ello es el efecto beneficioso que también se observa en su uso para casos de sepsis¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

Por otra parte, se ha descrito una disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de monocitos y macrófagos¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Además, el O₂HB ha demostrado en múltiples estudios la capacidad de inducir un aumento a la tolerancia ante isquemia en cerebro, médula espinal, hígado y músculo estriado, cuando se utiliza de manera profiláctica¹⁹¹⁻¹⁹⁶.

2.3.7. Vasodilatadores

Las células endoteliales del sistema microcirculatorio producen sustancias vasodilatadoras como es el óxido nítrico. Debido al daño endotelial secundario a la isquemia, esta función se pierde y disminuye la concentración de vasodilatadores endógenos. En consecuencia aumenta la resistencia vascular microcirculatoria y aumenta la presión de perfusión.

El efecto de los vasodilatadores sobre la isquemia tisular, caracterizado por su acción antagonista del vasoespasmo, se ha sugerido también importante para minimizar el daño tisular del síndrome por IR¹⁹⁷. Se ha demostrado su utilidad en diferentes modelos

en animales, empleando fármacos como bloqueantes de los canales del calcio (nifedipino, verapamilo, nitrendipino o diltiazem), agonistas β_2 adrenérgicos (salbutamol)^{198,199}, y asociando agentes α -bloqueantes²⁰⁰. Otros agentes antiisquémicos han sido valorados, empleando vasodilatadores y anticoagulantes de forma asociada, como la nitroglicerina o la pentoxifilina^{201,202}.

2. 3. 8. Inmunomoduladores

El daño producido por el síndrome por IR se puede considerar en última instancia un proceso inflamatorio en cuanto a su mecanismo fisiopatológico. No es de extrañar por tanto, que muchas de las dianas terapéuticas investigadas se dirijan en este sentido.

Numerosos inmunosupresores y antineoplásicos han sido estudiados en el tratamiento de modelos de IR en colgajos cutáneos. Se han valorado el papel del tacrólimus (FK506) a través de su papel en la reducción del infiltrado neutrofílico del colgajo⁸⁴, la utilidad de la fucoidina debido a su inhibición del rodamiento neutrofílico⁸⁵, el ácido fenetil éster cafeíco (CAPE)⁶⁹, y los antineoplásicos ciclofosfamida, cisplatino, mitomicina-C y 5-fluorouracilo⁹⁴.

Por otra parte, el metabolismo del ácido araquidónico genera sustancias proinflamatorias en células endoteliales, plaquetas y neutrófilos circulantes en respuesta a la isquemia, el leucotrieno B_4 y el tromboxano A_2 . Los leucotrienos tienen un papel importante en la estimulación de la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, permitiendo su activación y el consiguiente daño celular. Se ha demostrado que la

inhibición de la enzima 5-lipooxigenasa (responsable de la síntesis del leucotrieno B4) tiene un efecto protector tisular en el daño por IR en un modelo experimental con cerdos⁶⁴. La ciclooxigenasa es la enzima responsable de la síntesis del tromboxano A2 que es un potente vasoconstrictor y estimulante de la agregación plaquetaria. Su inhibición parece reducir la producción de RLO mediante la limitación de la adhesión leuco-endotelial^{40,203}.

Como ya hemos comentado, los factores del complemento constituyen uno de los mecanismos efectores del daño tisular como un mediador importante de la respuesta inflamatoria en el síndrome por IR. La inhibición del complemento ha sido utilizada a nivel sistémico, sobre el componente plasmático del complemento, de forma habitual. Más recientemente, varios estudios dirigen sus esfuerzos a aumentar la eficacia y a evitar efectos secundarios mediante su administración local, pre-reperusión sobre el tejido bajo el daño por IR exclusivamente. En éste último caso, la diana terapéutica la constituiría el complemento en su papel sobre las superficies celulares¹²⁵. A nivel experimental son numerosas las sustancias inhibidoras del complemento estudiadas. En cambio, a nivel clínico, solo anticuerpos anti-C5 (Eculizumab, Pexelizumab)^{142,143,145}, C1-INH¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ y el receptor recombinante soluble del complemento tipo 1 (sCR1)^{146,147,204} en diferentes escenarios de isquemia cardiaca y en trasplante pulmonar. Por el momento no está descrita la eficacia de la inhibición del complemento en la cirugía de los colgajos libres.

3. Preacondicionamiento isquémico

3.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTOS RELACIONADOS

El preacondicionamiento isquémico es un fenómeno por el cual breves episodios de isquemia alternados con reperusión desencadenan un mecanismo adaptativo, que confiere al tejido de cierta protección ante una futura isquemia prolongada (figura 4). En definitiva, aumenta la tolerancia de los tejidos al síndrome por IR.

Este fenómeno fue descrito por Murry en 1986 por primera vez, en un modelo experimental de isquemia cardíaca en perros¹⁵³. Posteriormente, estos resultados fueron refrendados en diferentes órganos como hígado¹⁵⁴ o riñón¹⁵⁵. Más tarde, se publicaron estudios valorando el efecto del preacondicionamiento isquémico en colgajos con similares resultados¹⁵⁶⁻¹⁶⁰.

Yendo más allá, se demostró que estos breves períodos de IR en un órgano o tejido determinado, no solo desencadenan un efecto protector local sobre él mismo, sino que también confiere protección en tejidos a distancia que sufran una isquemia mantenida²⁰⁵. Es lo que se denomina preacondicionamiento isquémico remoto (figura 4). Uno de estos estudios, por ejemplo, describe un aumento de la supervivencia en un colgajo cutáneo abdominal en rata mediante la aplicación de un breve período de isquemia en una de las patas del animal²⁰⁶.

Otro concepto relacionado con este fenómeno es el de postacondicionamiento isquémico (denominado por algunos autores como reperfusión intermitente)¹⁵⁸. En este caso, tras una isquemia primaria establecida se realizan breves períodos de reperfusión y oclusión del pedículo vascular, previa reperfusión definitiva (figura 4).

Al igual que en las técnicas de preacondicionamiento, el postacondicionamiento isquémico remoto (aplicación de breves períodos de isquemia reperfusión en un tejido a distancia del órgano afecto por una isquemia primaria prolongada) presenta efectos beneficiosos sobre el síndrome por IR^{207,208}.

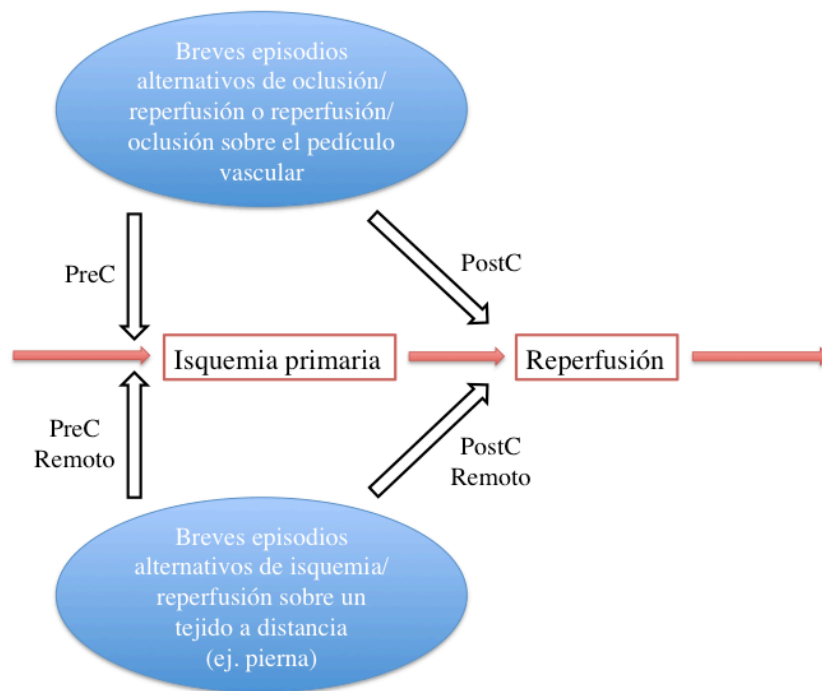


Figura 4. Representación esquemática de preacondicionamiento (PreC) y postacondicionamiento (PostC) isquémicos.

3.2. FISIOPATOLOGÍA DEL PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Como hemos visto anteriormente, pequeños períodos de isquemia y reperfusión antes de una isquemia prolongada disminuyen el daño por isquemia reperfusión¹⁵⁷.

Las bases moleculares del preconditionamiento isquémico no se comprenden completamente, pero hay evidencia científica que permite postular una serie ordenada de eventos. La técnica de preconditionamiento genera rápidamente mediadores de la vasodilatación (como son adenosina y óxido nítrico) que pueden considerarse el estímulo inicial. Estas sustancias activan una compleja cascada de transducción, mediada por la proteinquinasa C entre otros factores de transcripción, dando lugar a un aumento de la expresión genética y a la síntesis de proteínas efectoras. Serían estas proteínas efectoras las que confieren al tejido de protección ante un segundo estrés isquémico²⁰⁹.

La protección que le confiere al tejido dicho preconditionamiento se considera bifásico. La fase temprana tiene efecto precozmente y desaparece rápidamente, durando aproximadamente 2 horas^{207,208}. El efecto protector en este caso está determinado por proteínas preformadas a través de una serie de cascada de señales²¹⁰. Participan en ella varios mecanismos, pero el más relevante parece ser el aumento de adenosina y la consecuente activación de la proteína C²¹¹.

La fase tardía de protección se establece a partir de las primeras 12-24 horas tras la aplicación del preconditionamiento isquémico y permanece durante otros 2 o 3 días más²⁰⁷. La protección tardía está mediada por la expresión genética y la síntesis de nuevas proteínas. Algunos de estos factores desencadenantes de protección son las endotoxinas,

óxido nítrico sintetasas, agonistas de la adenosina, agonistas opioides y el factor de necrosis tumoral- α ^{210,212-214}.

Por otra parte, algunos estudios han investigado los posibles mecanismos del preconditionamiento remoto. Uno de ellos sugiere la implicación de los receptores de adenosina, puesto que el bloqueo de estos anuló los efectos beneficiosos del preconditionamiento²¹⁵. También hay indicios tanto de una participación humoral en el efecto protector del preconditionamiento²¹⁶ como de un papel de la inervación sensitiva de los órganos isquémicos²¹⁷.

3.3. USOS TERAPÉUTICOS

El preconditionamiento isquémico puede valorarse como técnica para atenuar el daño originado por el síndrome por IR. En casos de cirugía electiva, como en la transferencia de colgajos libres programada o en alotrasplante de tejidos compuestos, se puede aplicar las técnicas de el preconditionamiento isquémico “clásico” o remoto.

En el caso de extremidades amputadas o devascularizadas la oportunidad para la aplicación de preconditionamiento ya no existe. Este tipo de escenarios clínicos dan sentido a la utilización de las maniobras de postacondicionamiento (mediante la reperusión del miembro tras aplicar breves períodos de reperusión/oclusión sobre pedículo vascular reanastomosado) y de postacondicionamiento remoto (utilizando la

técnica sobre una de las extremidades sanas). Cabe destacar como ventajas importantes de estas maniobras que son sencillas y relativamente inofensivas¹⁶¹.

A pesar de que los efectos beneficiosos del preacondicionamiento “clásico” y remoto están ampliamente refrendados en estudios clínicos en el campo de la cirugía cardíaca, hepática y pulmonar, aun son necesarios grandes estudios aleatorios y multicéntricos que certifiquen la eficacia de estas intervenciones en tejido muscular y cutáneo humanos.

4. Inhibidor de la C1 esterasa

4.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

El inhibidor de la C1 esterasa (C1-INH) es un inhibidor de proteasas séricas de la familia de las serpinas. Las serpinas constituyen un grupo de proteínas plasmáticas con diversas funciones y una estructura similar que se ha conservado a lo largo de la evolución.

El C1-INH es una proteína constituida por una cadena glicosilada de 478 aminoácidos²¹⁸, con un peso molecular de 76 kDa y una concentración plasmática de 240 µg/ml (que equivale a 1 U/ml)^{219,220}. Presenta un dominio serpin formado por 365 aminoácidos y un extremo N-terminal formado por 113 aminoácidos.

Las serpinas se caracterizan por su estructura y su mecanismo de acción que puede expresarse como “inhibición suicida”. El C1-INH inactiva sus proteasas dianas mediante la formación de un enlace peptídico entre un residuo de arginina, presente en su centro activo, con una treonina presente en el lugar específico para el sustrato de la proteasa (P1: Arg444 – P1': Thr445), ejerciendo así una inhibición competitiva²²¹⁻²²³. La formación de esta unión covalente entre ambas proteínas inducen un cambio conformacional de las mismas que impiden cualquier acción proteolítica por parte de la proteasa^{224,225}. Estos complejos proteasa-serpina se retiran de la circulación mediante metabolismo hepático y mediante la acción de neutrófilos y monocitos, con una tasa de aclaramiento de 20 – 47 min²²⁶.

4.2. MECANISMO DE ACCIÓN

La acción más importante del C1-INH es la inhibición de proteasas séricas. Además se han descrito interacciones no covalentes del C1-INH con diferentes sustancias. Algunas de estas moléculas son componentes de la matriz extracelular, el componente C3 del complemento, células endoteliales y leucocitos, las endotoxinas de gram negativos y algunos agentes infecciosos.

4.2.1. Inhibición de las proteasas

El C1-INH fue descubierto en 1957 por Ratnoff y Lepow, que describieron un factor termolábil en el plasma humano que inhibía el primer componente del sistema del complemento²²⁷. Más tarde se estableció el papel del C1-INH en la inactivación de C1s y C1r^{221,228}, constituyendo la única molécula plasmática encargada de la regulación de la vía clásica del complemento. También presenta un papel regulador de la vía de las lecitinas mediante su actividad inhibidora de la proteasa MASP2²²⁹⁻²³¹.

El sistema de contacto o sistema de la kaliceína-kinina está constituido por un conjunto de proteínas plasmáticas, cuya activación determina la producción de bradicinina y la activación de la vía intrínseca de la coagulación, dando lugar a una importante alteración de la permeabilidad vascular. El C1-INH es el principal regulador del sistema de contacto a través de la inactivación de la kaliceína plasmática, el factor XIIa y el factor XIa^{222,232-235}. Este hecho fue descubierto tras la observación de un defecto en la capacidad inhibidora de la kaliceína en pacientes con angioedema hereditario²³⁶.

Otras muchas proteasas son inactivadas por el C1-INH como son la plasmina y el activador tisular del plasminógeno (t-PA)²³⁷⁻²⁴⁰.

4. 2. 2. Interacción no covalente con proteínas endógenas

El C1-INH interfiere con la unión de los factores C3b y B del complemento mediante una interacción reversible con el factor C3b. De este modo, presenta también cierta actividad inhibidora de la vía alternativa del complemento, aunque su importancia biológica aun no está establecida²⁴¹.

Este tipo de reacciones reversibles también las establece con algunas proteínas de la matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina y entactina)²⁴². Se ha demostrado que las uniones que establece con estas proteínas tisulares no afectan a su actividad como inhibidor de las proteasas. Parece posible que la finalidad de estas uniones sea aumentar la concentración del C1-INH en zonas no vascularizadas donde se desarrolla un proceso inflamatorio, y ejercer así su papel regulador de los sistema de complemento y de contacto²⁴³.

4. 2. 3. Interacción con células

Se ha descrito la capacidad del C1-INH de unirse a neutrófilos a través de su extremo amino terminal hiperglicosilado²⁴⁴. En un estudio experimental se determinó cierta mejora en la actividad fagocítica y lítica en neutrófilos y macrófagos como

consecuencia de esta interacción²⁴⁵. Pero aún no está completamente establecido el papel biológico del C1-INH en la actividad neutrofílica.

Por otra parte, se ha descrito la capacidad del C1-INH de establecer uniones con las células endoteliales, manteniendo su actividad inhibidora del factor C1s del complemento. También se ha podido observar la unión del C1-INH con las selectinas P y E, tanto es su fase plasmática como en su papel de señales en las membranas celulares endoteliales. Durante un proceso inflamatorio, el C1-INH competiría por las selectinas con los macrófagos y neutrófilos, disminuyendo así la adhesión de éstos últimos a la pared vascular^{246,247}.

4. 2. 4. Interacción con agentes infecciosos

La metaloproteasa secretada por el *E. coli* O157:H7 divide la molécula del C1-INH en la zona del dominio amino terminal hiperglicosilado²⁴⁸. Esta modificación en el C1-INH parece aumentar su acción inhibidora del complemento y, por tanto, la disminución de las defensas naturales frente a este agente patógeno²⁴⁹.

Otro ejemplo de este tipo de interacciones lo constituye la capacidad del C1-INH de unirse a las endotoxinas producto de infecciones por gram negativos, concretamente a los lipopolisacáridos (LPS) de la *Salmonella typhimurium*. La unión del C1-INH con los LPS impide el reconocimiento de estos últimos por parte de los receptores de membrana de los macrófagos. En consecuencia, se evitaría la liberación del factor de necrosis tumoral α por parte de los macrófagos, que es uno de los principales mediadores del

shock endotóxico. Los datos extraídos de estos estudios atribuyen al C1-INH un papel protector en el shock endotóxico²⁵⁰.

Por último, hay estudios que han establecido la interacción del C1-INH a algunas cepas virulentas de *Bordetella pertusis*²⁵¹ y también cierta capacidad de unión a *Plasmodium falciparum* y a los eritrocitos infectados por estas²⁵².

4.3. USOS TERAPÉUTICOS

Como hemos visto en el apartado anterior el C1-INH es una molécula con potenciales beneficios a muchos niveles, principalmente relacionados con el campo de la inmunidad pero no solo limitado a este ámbito. A continuación repasaremos algunos de los usos terapéuticos establecidos o en fase experimental, incluyendo el objeto de este proyecto: el daño por IR.

4.3.1. Angioedema hereditario

El angioedema hereditario es una enfermedad de herencia autosómica dominante que cursa con episodios de edema de piel y mucosas que puede llegar a ser tan importante como para causar obstrucción de la vía aérea. Fisiopatológicamente se caracteriza por una disminución de los niveles funcionales del C1-INH, ya sea por bajos niveles de la proteína (tipo I) o por presentar una proteína disfuncional (tipo II). Un posible tratamiento de esta enfermedad y profilaxis de los episodios de edema es suplir el defecto

proteico mediante la administración exógena del C1-INH purificado procedente de plasma humano.

4. 3. 2. Sepsis

La sepsis se define como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica causada por una infección. Se caracteriza por una excesiva liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo al sistema del complemento y al sistema de contacto. Esta activación del complemento resulta evidente tanto en estudios experimentales en animales como en afectación clínica de humanos. Este estado inflamatorio cumple con su función biológica de combatir el proceso infeccioso, pero puede resultar nocivo si es excesivo.

El proceso séptico se desarrolla por una excesiva liberación y activación de mediadores endógenos de la inflamación, que incluyen al sistema del complemento y al sistema de contacto²⁵³. El C1-INH constituye un importante inmunomodulador en respuesta a un proceso séptico, aumentando su concentración en plasma hasta 2,5 veces²⁵⁴⁻²⁵⁷. Desde este punto de vista, es razonable pensar que la administración de C1-INH exógeno tenga un efecto terapéutico sobre la sepsis. Múltiples estudios en animales confirman esta hipótesis analizando diferentes parámetros bioquímicos relacionados con el desarrollo de la sepsis²⁴⁵. En humanos, existen algunos estudios preliminares que demuestran un beneficio en la hipotensión vascular²⁵⁸, en la función renal²⁵⁴ y descenso de parámetros relacionados con el sistema del complemento y de contacto.

4. 3. 3. Trasplantes.

Uno de los retos en el trasplante de órganos es evitar el rechazo del órgano del donante por parte del receptor. Se tiene la certeza de que en el rechazo hiperagudo interviene el complemento activado por inmunoglobulinas preformadas. El rechazo hiperagudo no es un problema frecuente en alotrasplantes pero sí una importante limitación para los xenotrasplantes. También en el rechazo agudo parece participar el sistema del complemento entre otros componentes del sistema inmune.

Por último, el trasplante de órganos constituye uno de los modelos fisiopatológicos del daño por isquemia-reperfusión puesto que el órgano sufre un período de isquemia desde su separación del donante hasta su implantación en el receptor. Son múltiples los estudios realizados *in vitro*²⁵⁹, *ex vivo*^{260,261} e *in vivo*²⁶² para el estudio de los potenciales efectos beneficiosos del C1-INH en el campo de los trasplantes de órganos.

Dentro del campo de la cirugía reconstructiva, está adquiriendo creciente importancia las técnicas de alotrasplante de tejidos compuestos (trasplante de cara, de miembro superior, de miembros inferiores). También este tipo de trasplantes se verían beneficiados de un tratamiento que combata al mismo tiempo el daño por IR y el fenómeno de rechazo.

4. 3. 4. Daño por isquemia-reperfusión.

Anteriormente en este texto hemos definido el daño por IR y el papel del sistema del complemento entre otros factores en su fisiopatología. El C1- INH es por tanto un fármaco con posibilidades terapéuticas en este campo.

El efecto del C1-INH ha sido ampliamente estudiado en modelos de experimentación animal de daño por IR. La mayoría de las publicaciones proceden de estudios en infarto de miocardio. Estos estudios demuestran que la administración del C1-INH justo antes o en el momento de la isquemia resulta beneficioso con reducción en el daño miocárdico, disminución del infiltrado neutrofílico, disminución de los niveles creatinkinasa, troponina T, C3a y C5a, y supresión de la expresión endotelial de selectina p^{141,263-265}.

También se han utilizado otros modelos de daño por IR en animales con resultados igualmente positivos tras la administración de C1-INH. Algunos de estos ejemplos son en modelos experimentales de isquemia en músculo esquelético^{266,267}, en hígado^{127,268,269}, en oclusión de la arteria cerebral media^{139,270-272} y en isquemia intestinal tras oclusión de la arteria mesentérica superior²⁷³⁻²⁷⁵.

Es interesante resaltar que los parámetros valorados en estos estudios indican que el efecto beneficioso del C1-INH en el daño por IR no se debe exclusivamente a la inhibición del complemento y sistema de contacto. Otros mecanismos, como el efecto inhibidor de la migración leucocitaria mediante la interacción con receptores de membrana endoteliales parecen estar implicados en este proceso (Selectinas E y P)²⁴⁵.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El síndrome de isquemia reperusión es el conjunto de sucesos fisiopatológicos que suceden en un tejido, desde la instauración en él de un período de isquemia, hasta la reperusión posterior del mismo. Dicho síndrome puede desencadenar la pérdida parcial o completa de los colgajos cutáneos microvascularizados, cuya técnica quirúrgica implica necesariamente un período de isquemia y su posterior reperusión.

Entre los mecanismos fisiopatológicos implicados en el síndrome de IR está el sistema del complemento. La modulación de su actividad mediante la administración del C1-INH, ha demostrado ser útil en el tratamiento de dicho síndrome en diversos modelos experimentales, sin haberse valorado su aplicación en colgajos microvasculares.

Por otra parte, el preconditionamiento isquémico se considera una estrategia encaminada a atenuar los efectos adversos del síndrome por IR.

En base a esto, cabría plantearnos el efecto beneficioso del empleo de C1-INH en un modelo experimental de isquemia reperusión en un colgajo cutáneo microvascularizado, así como comparar su efecto con el preconditionamiento isquémico, y evaluar un posible efecto sinérgico entre ambos.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

1. General

- Analizar el papel del complemento y su modulación en un modelo experimental de isquemia reperusión en los colgajos cutáneos microvascularizados.

2. Específicos

- Evaluar la repercusión del síndrome por isquemia reperusión en un modelo experimental de isquemia reperusión en colgajos cutáneos microvascularizados.
- Determinar mediante indicadores clínicos, bioquímicos y anatomopatológicos el sufrimiento tisular en un modelo de isquemia reperusión en colgajos cutáneos microvascularizados.
- Determinar el posible efecto terapéutico del preconditionamiento isquémico en la lesión por isquemia reperusión en los colgajos cutáneos microvascularizados.
- Determinar el posible efecto terapéutico del inhibidor de la C1 esterasa en la lesión por isquemia reperusión en los colgajos cutáneos microvascularizados.
- Determinar el posible efecto sinérgico del preconditionamiento isquémico y del inhibidor de la C1 esterasa como terapéutica en la lesión por isquemia reperusión en colgajos cutáneos microvascularizados.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

IV. MATERIAL Y MÉTODO

1. Animales

1.1. RATA WISTAR: CARACTERÍSTICAS GENERALES

Nomenclatura: WI (IOPS AF/Han)

Clasificación Taxonómica:

- Clase: Mammalia.
- Subclase: Theria.
- Infraclass: Eutheria.
- Orden: Rodentia.
- Suborden: Myomorpha.
- Superfamilia: Muroidea.
- Familia: Muridae.
- Subfamilia: Murinae.
- Género: Rattus.
- Especie: Norvegicus.

1.2. RATA WISTAR: PARÁMETROS

- **Características generales:**

Peso macho (adulto): 300-400 gr.

Peso hembra (adulto): 250-300 gr.

Peso en las crías (recién nacido): 5-6 gr.

Vida media: 2,5-3 años (máximo registrado 4 años 8 meses).

Número de cromosomas (diploide): 42.

Consumo de agua (adulto): 80-110 ml/Kg/día.

Consumo de alimento (adulto): 100 gr/Kg/día.

Temperatura corporal: 37,5 °C (rectal).

Frecuencia cardíaca: 330-480 latidos/min.

Tensión arterial: sistólica 116 (88-184) / diastólica 90 (58-145) mmHg.

Gasto cardíaco: 50 (10-80) ml/min.

Volumen plasma: 40,4 (36,3-45,3) ml/Kg.

Volumen sanguíneo total: 64,1 (57,5-69,9) ml/Kg.

Frecuencia respiratoria: 85,5 (66-114) /min.

Volumen corriente: 0,86 (0,60-1,25) ml.

Volumen minuto: 0,073 (0,05-0,101) ml.

Volumen latido: 1,3-2,0 ml/latido.

Plasma pH: 7,4 ± 0,06.

Orina pH: 7,3-8,5.

Densidad específica de la orina: 1,04-1,07.

- **Hematología:**

Hemoglobina: 15,6 gr/dl.

Hematocrito: 46%.

Hematíes $7,2-9,6 \times 10^6/\text{mm}^3$.

Serie blanca

Total $14 (5,0-25,0) \times 10^3/\mu\text{l}$.

Neutrófilos 22 (9-34) %.

Linfocitos 73 (65-84) %.

Monocitos 2,3 (0-5) %.

Eosinófilos 2,2 (0-6) %.

Basófilos 0,5 (0-1,5) %.

Plaquetas $761 \pm 153 \times 10^9/\text{l}$.

2. Mantenimiento de los animales

Todo el proceso experimental y de mantenimiento de los animales, así como el sacrificio y toma de muestras, se desarrolló en las instalaciones del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres.

Los animales tuvieron un período de acomodación de 15 días previos a su entrada en el protocolo experimental en los estabularios donde se mantuvieron. El ambiente en los locales de permanencia de los animales tuvo las siguientes características:

- Ventilación: sistema de ventilación adecuado a las exigencias, para eliminar el exceso de calor y humedad y para permitir la entrada de aire puro y eliminar los olores, los gases tóxicos, el polvo y todo tipo de material infeccioso. El aire fue renovado frecuentemente (15/20 recambios/hora).
- Temperatura: controlada con termostato, variable entre 21-25°C.
- Humedad: las variaciones extremas de humedad relativa fueron mantenidas entre $55\% \pm 10\%$, sin superar nunca por debajo el 40% y por encima el 70%.
- Iluminación: iluminación artificial controlada, mediante ciclos de 12 horas de luz alternados con 12 horas de oscuridad.
- Ruidos: considerando que los ruidos pueden constituir un factor de molestia para los animales, los estabularios utilizados tienen un diseño arquitectónico que evita al máximo este elemento distorsionador.

La alimentación de los animales, a la que pudieron acceder libremente, consistió en pienso estándar para roedores de laboratorio (Harlan Laboratories®) con una energía metabolizante de 2,9 kcal/g, y agua corriente de uso humano (administrada en reservorios de agua renovados diariamente). Fueron efectuados controles diarios para verificar sus condiciones físicas. En el postoperatorio las ratas fueron acomodadas de forma individual para prevenir el canibalismo del colgajo cutáneo.

3. Intervención quirúrgica

3.1. COLGAJO EPIGÁSTRICO DE RATA

El colgajo epigástrico de rata es un colgajo cutáneo en isla basado en arteria y vena epigástrica de la rata. Es un modelo con una anatomía constante y fácilmente reproducible que lo hacen muy adecuado para el estudio del síndrome por IR. Es un colgajo de patrón vascular axial basado en arteria y vena epigástricas inferiores²⁷⁶. El pedículo vascular tiene su origen en los vasos femorales, distal al ligamento inguinal. Presenta un recorrido inicialmente medial y posteriormente ascendente en dirección al hemiabdomen correspondiente siendo responsable de su vascularización.

3.2. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Las ratas son anestesiadas por vía inhalatoria, utilizando el siguiente protocolo:

- Pre-oxigenación: administramos oxígeno durante 5 minutos en la cámara de inducción.
- Inducción: administramos flujo de oxígeno con sevoflurano (Sevorane®) al 1% durante 1 minuto, para pasar al 5% hasta la pérdida de conciencia del animal.
- Mantenimiento: colocamos al animal una mascarilla aportando un flujo de 350 ml de oxígeno/min con sevoflurano al 3% (figura 5).

- Recuperación: cerramos el vaporizador de sevoflurano y mantenemos el flujo de oxígeno hasta que el animal se despierta.

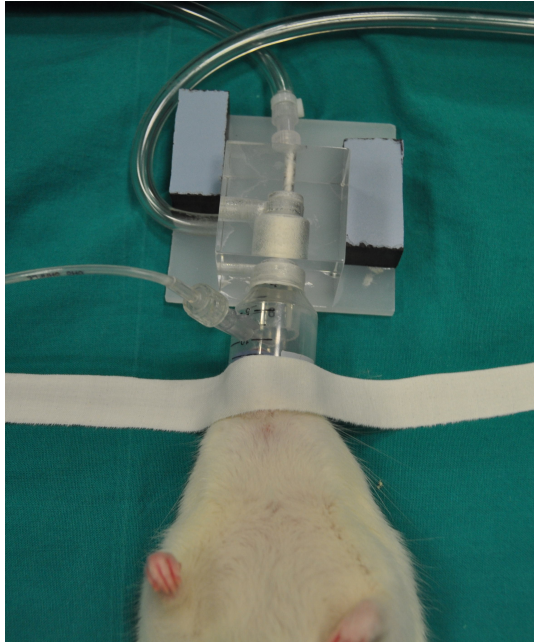


Figura 5. Mascarilla para mantenimiento anestésico.

Como antibioterapia profiláctica se administra enrofloxacino (Baytril®) vía subcutánea (10 mg/kg/día repartidos en dosis cada 12 horas, durante 3 días). La pauta analgésica postoperatoria consistió en meloxicam (Metacam®) 2 mg/Kg cada 24 horas vía subcutánea.

Una vez anestesiadas, se prepara el campo quirúrgico mediante rasurado del abdomen. Se diseña el colgajo cutáneo epigástrico de 7 x 3 cm de tamaño en hemiabdomen izquierdo, considerando los límites anatómicos descritos en la bibliografía. Estos límites son la línea media sagital, el reborde costal izquierdo, la línea axilar

izquierda y la línea base del pene-rodilla izquierda como límites medial, craneal, lateral y caudal respectivamente²⁷⁷. (figura 6) El área fue preparada para el procedimiento quirúrgico empleando una solución de povidona yodada al 10% (Betadine®). Durante toda la intervención, la asepsia se preservó asegurando un ambiente estéril mediante las maniobras quirúrgicas elementales



Figura 6. Diseño preoperatorio del colgajo epigástrico.

Se procede a la disección del colgajo cutáneo epigástrico con un diseño en isla. Se incide la piel profundizando hasta sobrepasar el panículo carnosus y se eleva el colgajo en el plano suprafascial. Se realiza una suave tracción del colgajo que permite identificar el pedículo vascular, las arteria y vena epigástricas inferiores. Para permitir la

manipulación del pedículo, se eskeletoniza el pedículo, disecando arteria y vena femoral tanto a nivel proximal como distal al origen de los vasos epigástricos (figura 7).

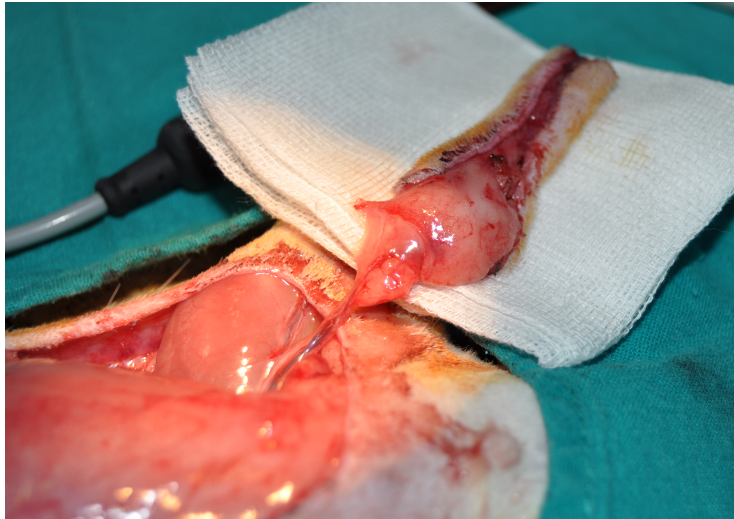


Figura 7. Colgajo epigástrico izquierdo elevado en isla, se observa pedículo epigástrico eskeletonizado.

3.3. INDUCCIÓN DEL SÍNDROME POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN

Se somete al colgajo a un período de isquemia primaria mediante la aplicación de un clamp microvascular simple (tipo B-1, S&T AG®) en los vasos femorales proximal a la salida de del pedículo epigástrico, y mediante una ligadura distalmente (figura 8). Posteriormente se reposiciona el colgajo mediante suturas interrumpidas tipo colchonero.

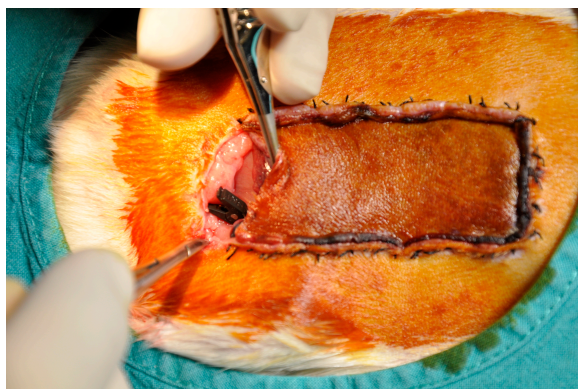


Figura 8. Clamp microvascular localizado en los vasos femorales.

Tras un período de 8 horas se procede a la reperfusión del colgajo. Para ello, se somete al animal a una nueva anestesia, se retira el clamp microvascular a través de un mínimo abordaje en la sutura inferior del colgajo (figura 9). Una vez comprobada la adecuada permeabilidad del pedículo se procede a rehacer la sutura en el borde inferior del colgajo (figura 10).

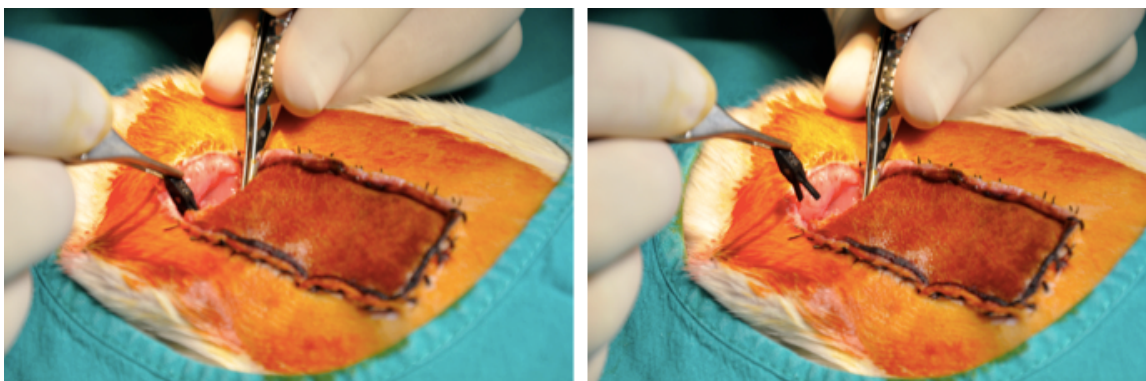


Figura 9. Retirada del clamp microvascular tras el período de isquemia primaria.

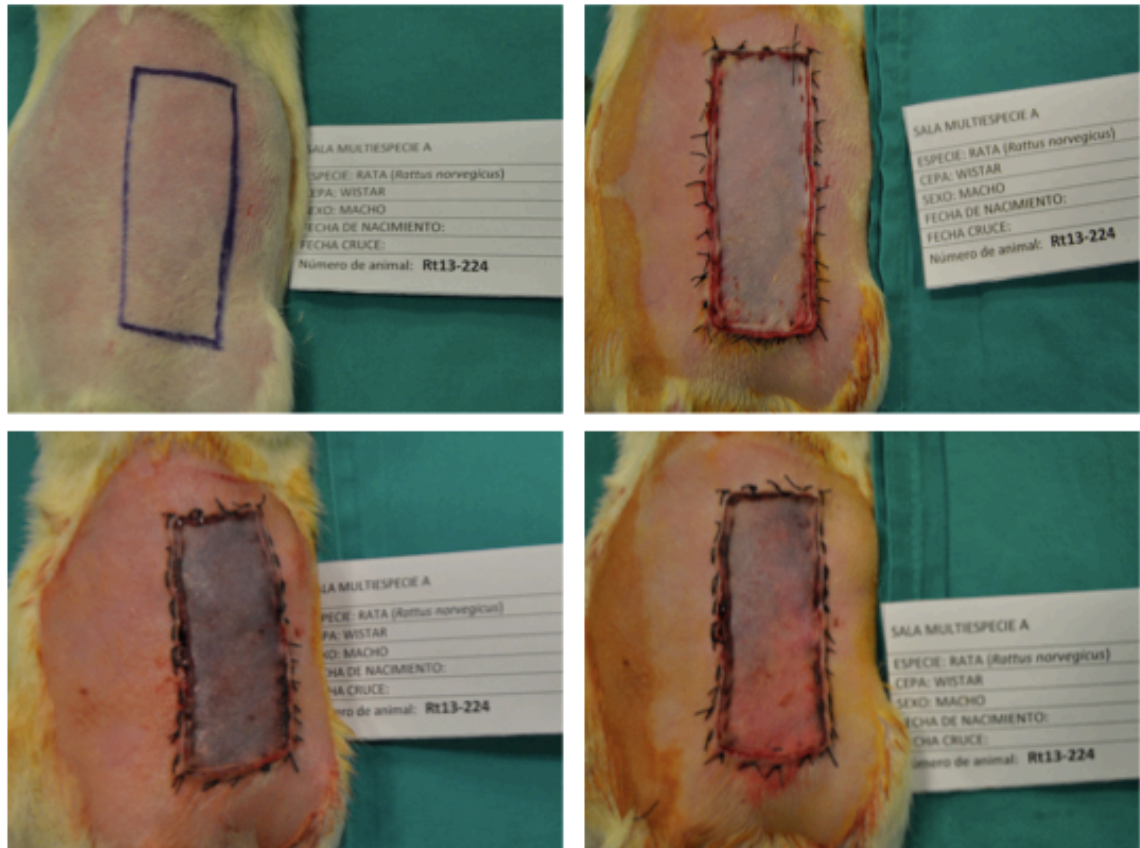


Figura 10. Marcaje preoperatorio del colgajo epigástrico (izquierda arriba). Aspecto del colgajo en el postoperatorio inmediato, tras clampaje del pedículo femoral, ligeramente congestivo (derecha arriba). Aspecto congestivo del colgajo tras 8 horas de isquemia, previo a la perfusión del mismo (izquierda abajo). Signos de perfusión inicial minutos de liberar el clamp femoral (derecha abajo).

Para evitar el autocanibalismo se utilizó en todos los animales un vendaje protector para el período postoperatorio. Es un vendaje manufacturado que se compone de dos partes: una banda elástica que rodea al animal en su región torácica y se fija en el dorso del animal con ayuda de un velcro; y un material plástico flexible que se fija a la banda elástica por la región ventral del animal figura 11). Este vendaje cumple una doble

función, limitando la capacidad flexora del tronco de la rata (banda torácica) y dificultando el acceso con la boca a la herida quirúrgica (material plástico).

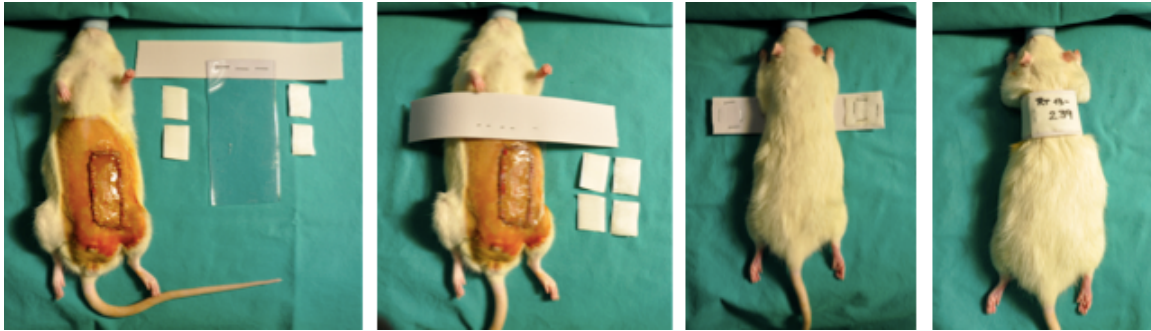


Figura 11. Manufactura y colocación del vendaje protector.

3.4. PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

En aquellos animales en los que se estudia el efecto del preconditionamiento isquémico, se realizan tres ciclos de 10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de perfusión. Para ello, se someten a la aplicación y liberación sucesivas de un clamp microvascular sobre los vasos femorales proximal al origen de los vasos epigástricos (distalmente se ligan los vasos femorales). Posteriormente se procede al período de isquemia primaria de 8 horas de manera similar a lo descrito en el anterior apartado.

3.5. PAUTA DE ADMINISTRACIÓN DEL C1-INH

El C1-INH es un fármaco cuyos efectos beneficiosos sobre diferentes modelos de IR están ampliamente refrendados en la bibliografía²⁵².

La fórmula farmacéutica del C1-INH (Berinert®) consiste en un vial de polvo blanco liofilizado (500 UI de C1-INH) y otro de 10 ml de agua destilada para su reconstitución. Una vez reconstituido, debe mantenerse a una temperatura inferior a 25 °C y estar protegido de la luz. El fabricante indica que la estabilidad físico-química de la molécula es de 48 horas tras la reconstitución si se conserva en las condiciones adecuadas. En nuestro estudio, conservamos el excedente de C1-INH reconstituido generando alícuotas de 1,5 ml y manteniéndolas a -80°, para utilizarlo en días posteriores.

La pauta de administración del C1-INH es de 100 UI/kg mediante infusión lenta de un bolo intravenoso a través de una de las venas laterales de la cola de la rata.

4. Diseño del estudio

Se trata de un estudio experimental prospectivo en el que se ha empleado 50 ratas Wistar macho de 430-530 gr de peso. Los animales fueron randomizados en 5 grupos experimentales:

- **Grupo control** (figura 12): formado por 10 animales, en los que el colgajo disecado no fue sometido a isquemia (no se provocó un síndrome por IR).



Figura 12. Esquema de actuación en el grupo control.

- **Grupo 1**(figura 13): formado por 10 animales, en los que se indujo un síndrome por IR con una duración de la isquemia de 8 horas (8h).

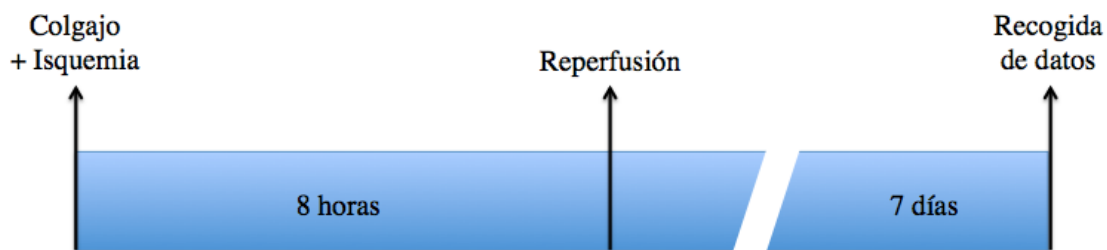
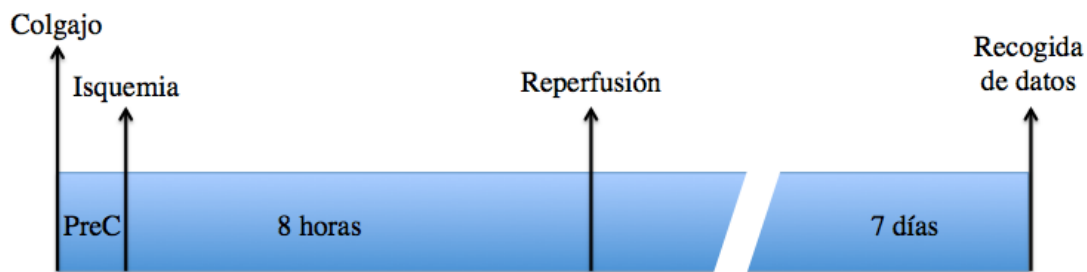


Figura 13. Esquema de actuación en el grupo 1.

- **Grupo 2** (figura 14): formado por 10 animales, en los que se realizó preacondicionamiento isquémico (PreC) según la técnica descrita y posteriormente se indujo un síndrome por IR con una duración de la isquemia de



8 horas (8h).

Figura 14. Esquema de actuación en el grupo 2.

- **Grupo 3** (figura 15): formado por 10 animales, en los que se indujo un síndrome por IR con una duración de la isquemia de 8 horas (8h). Cinco minutos previos a la reperusión se realizó la infusión intravenosa de C1-INH (100 UI/Kg).

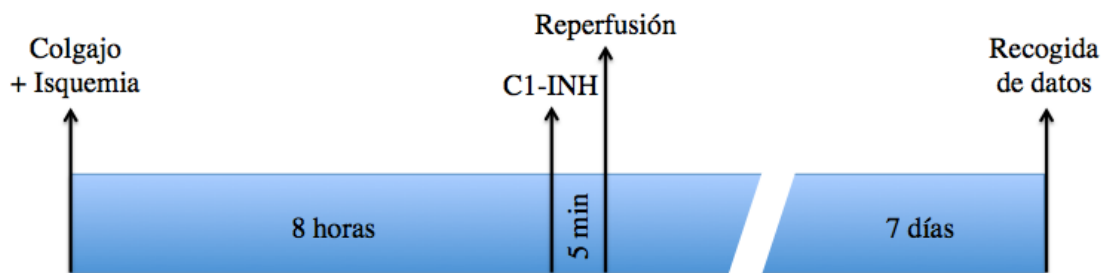


Figura 15. Esquema de actuación en el grupo 3.

- **Grupo 4** (figura 12): formado por 10 animales, en los que se realizó precondicionamiento isquémico (PreC) según la técnica descrita y posteriormente se indujo un síndrome por IR con una duración de la isquemia de 8 horas (8h). Cinco minutos previos a la reperfusión se realizó la infusión intravenosa de C1-INH (100 UI/Kg).

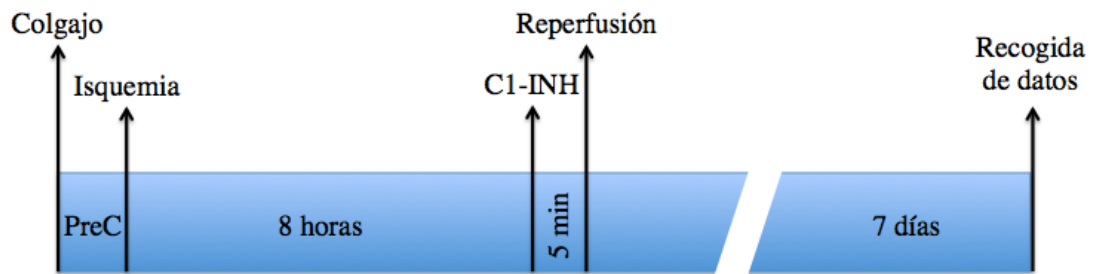


Figura 16. Esquema de actuación en el grupo 4.

5. Sacrificio y toma de datos

Los animales fueron sometidos a una nueva anestesia inhalatoria con sevoflurano en el séptimo día postoperatorio, momento de la recogida de datos.

Para la toma de datos del colgajo, primero se realizó un examen macroscópico del colgajo. Los colgajos fueron registrados mediante fotografía digital para posterior correlación (figura 17).

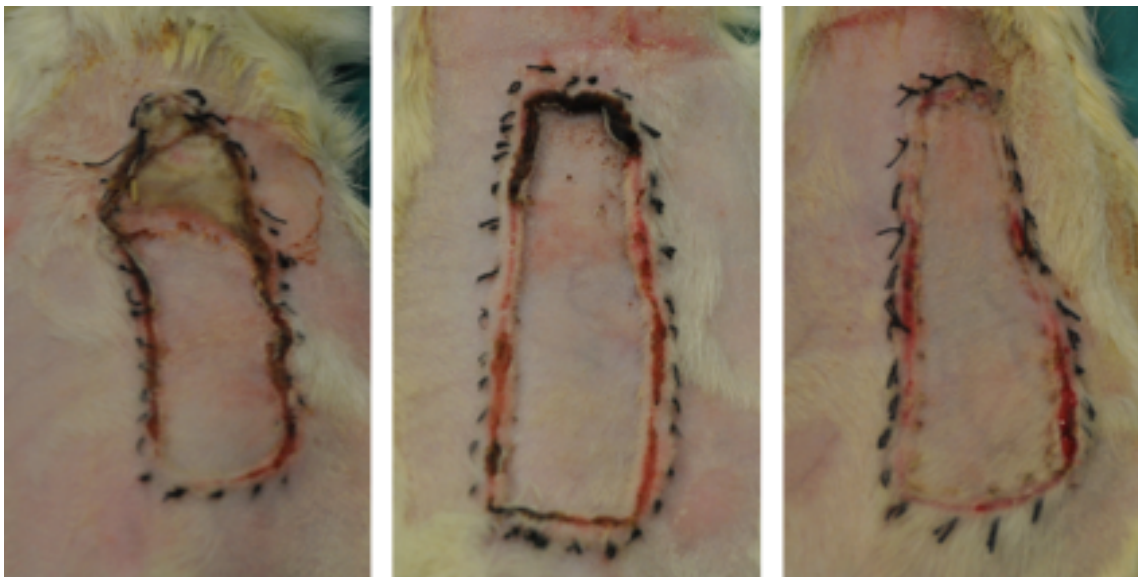


Figura 17. Ejemplos de fotografías clínicas recogidas en el 7º día postoperatorio.

A continuación, se retiraron las suturas y se desprendió el colgajo epigástrico del lecho manteniendo la integridad del pedículo vascular. El colgajo se divide en dos mitades por su eje longitudinal, utilizando la mitad medial para el análisis bioquímico y la mitad lateral para el análisis histopatológico (figura 18).

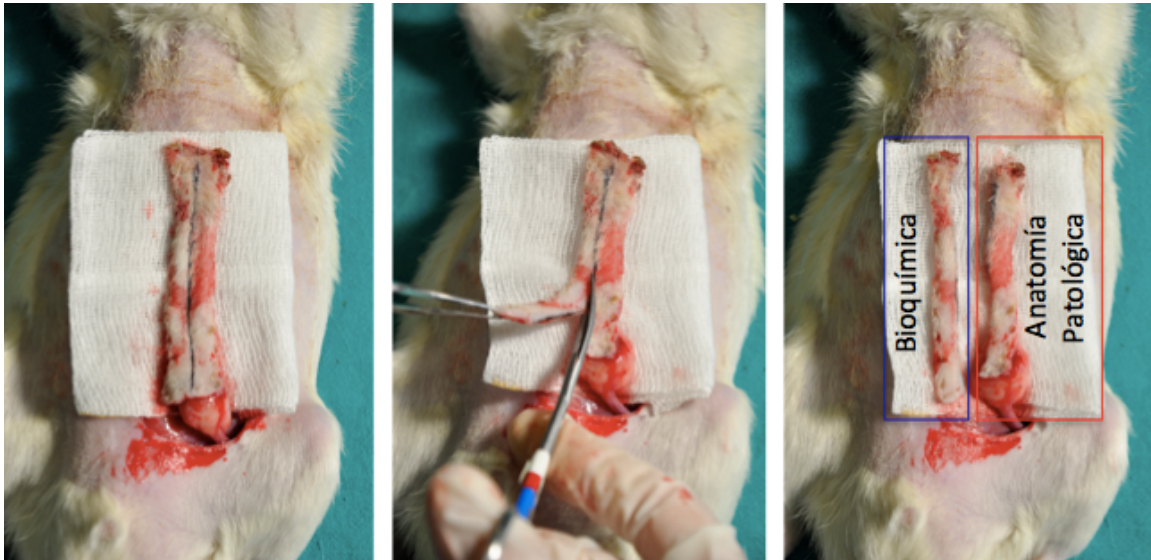


Figura 18. Recogida y división del colgajo para la toma de muestras.

La muestra que será utilizada en nuestro estudio bioquímico se introduce en una bolsa hermética que, tras ser etiquetada, se congela a -80° con nitrógeno líquido (figura 19). La muestra dirigida al estudio histopatológico se marca con una sutura a 3 cm de la base del colgajo, nivel donde se procesarán los cortes para su estudio. La muestra se fija en una superficie plana con chinchetas para evitar pliegues. Se conserva en formol al 10% durante tres días, y posteriormente se cambian a alcohol de 70° para evitar la hiperfijación de la muestra (figura 20).



Figura 19. Conservación de la muestra para el estudio bioquímico.

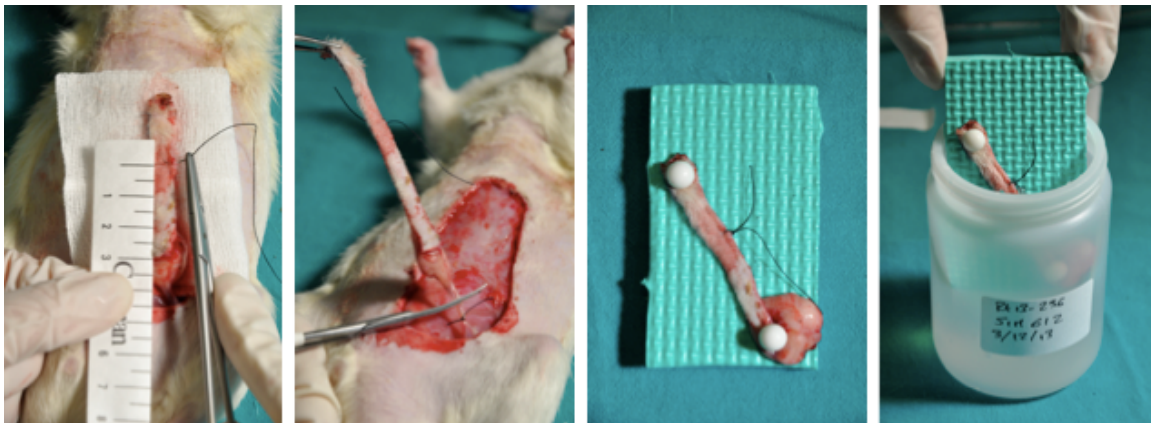


Figura 20. Conservación de la muestra para el estudio histopatológico.

Una vez concluida la toma de muestras, y manteniendo la anestesia general del animal, se procede al sacrificio del animal mediante inyección intracardiaca de cloruro potásico.

6. Material empleado

6.1. MANTENIMIENTO Y TERAPIA

- Balanza de peso en gramos (Precisa 3000 D. AG®).
- Jaulas de alojamiento con comedero y bebedero conjunto.
- Rasuradora para animales (Aesculap Electra II).
- Meloxicam (Metacam® 20 mg/ml, Boehringer Ingelheim España).
- Enrofloxacino (Baytril® 2,5%, Bayer)
- Inhibidor de la C1 esterasa (Berinert®, CSL Behring).
- Sevoflurano (Sevorane®, Abbott España).
- Cloruro potásico 10% (Fresenius Kabi).
- Povidona yodada 10% (Betadine®).
- Mango de bisturí. Hoja de bisturí del número 15.
- Pinzas de disección Adson con dientes de 12 cm.
- Porta-agujas Gillies de 15 cm.
- Tijeras de Iris curva de 11 cm.
- Clamp microvascular simple (tipo B-1, S&T AG®).
- Sutura seda mersilk 4/0 con aguja triangular de 3/8 de circunferencia (Ethicon®).
- Aguja inyección subcutánea (25G) (BD Microlance).
- Aguja inyección subcutánea (20G) (BD Microlance).
- Jeringas de insulina de 1 ml; Jeringas de 5 y 10 ml.
- Gasas y compresas estériles. Paños verdes estériles. Guantes estériles.
- Cinta elástica de 3,5 cm de ancho.

- Velcro de 1,5 cm de ancho.
- Material plástico flexible.

6.2. SACRIFICIO DE ANIMALES

- Rasuradora para animales (Aesculap Electra II).
- Sevoflurano (Sevorane[®], Abbott España).
- Cloruro potásico 10% (Fresenius Kabi).
- Mango de bisturí. Hoja de bisturí del número 15.
- Tijeras de Iris curva de 11 cm.
- Pinzas de disección Adson con y sin dientes de 12 cm.
- Gasas y compresas estériles. Paños verdes estériles. Guantes estériles.
- Aguja inyección (BD Microlance) subcutánea (25G).
- Jeringas de insulina de 1 ml; Jeringas de 5 y 10 ml.

6.3. TOMA DE MUESTRAS

- Suero fisiológico.
- Paraformaldehído.
- Alcohol 70°
- Bote para muestras de Anatomía Patológica (250 ml)
- Hoja de bisturí del número 23.
- Cámara de fotografía digital.

7. Parámetros analizados

7.1. PARÁMETROS CLÍNICOS

La repercusión clínica del daño por IR se corresponde con la necrosis parcial o completa del colgajo. Por este motivo, se evalúa el porcentaje de supervivencia del colgajo epigástrico de la rata. Es decir, la porción sin signos clínicos de necrosis respecto del área total del colgajo. En cada grupo se calcula la media de los porcentajes de supervivencia +/- desviación estándar.

7.2. PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS

Las lesiones titulares que significarían una evolución tórpida del colgajo, son clasificadas de acuerdo con los criterios de anatomía patológica (mismos criterios anatomopatológicos que en los seres humanos). Se han evaluado de manera los siguientes parámetros anatomopatológicos de daño tisular:

- Edema dermoepidérmico.
- Infiltrado inflamatorio.
- Neovascularización.

7.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

A nivel bioquímico, el daño por isquemia reperusión se manifiesta en los tejidos con alteración de los marcadores de estrés oxidativo. En este sentido, las determinaciones efectuadas han sido:

- Glutación reducido (GSH).
- Malonildialdehído (MDA), como principal exponente de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Superóxido dismutasa (SOD).

8. Determinación de parámetros clínicos

Se realizan fotografías clínicas en todos los animales de estudio en los momentos pre y postoperatorios del día 0, y previos a la división del colgajo en el día de la toma de muestras (día 7).

El porcentaje de supervivencia del colgajo (porción que no presenta signos clínicos de necrosis respecto del total del área del colgajo) se calcula mediante planimetría (ImageJ 1.47 para Mac). Este programa informático permite medir el tamaño de una imagen en píxeles. Por tanto, podemos establecer el porcentaje de supervivencia calculando la relación entre el número total de píxeles del colgajo completo respecto al tamaño en píxeles del área desvitalizada. Se toman tres medidas de cada área y se realizan los cálculos contemplando la media aritmética de estas 3 mediciones (figura 21).

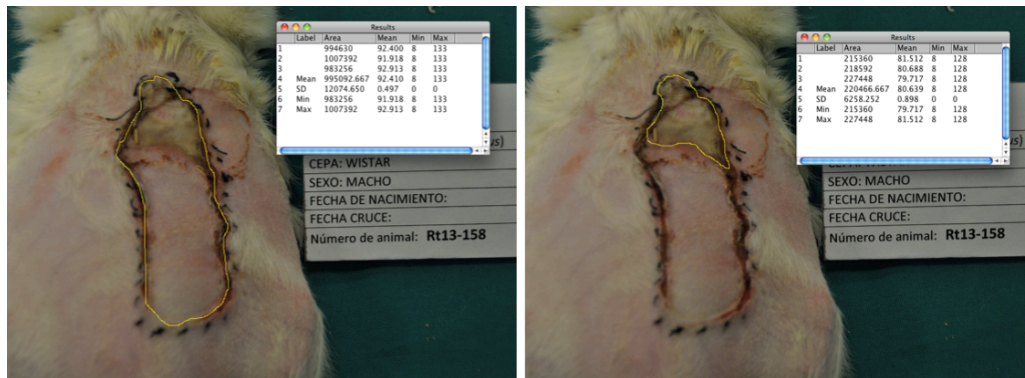


Figura 21. Medición del área total del colgajo y del área desvitalizada en píxeles, con ImageJ.

9. Determinación de parámetros histopatológicos

El estudio anatomopatológico fue realizado en las instalaciones del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, Universidad de Granada. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y se evaluaron de forma independiente por dos patólogos expertos, desconociendo el grupo experimental al que fue asignada cada rata.

Fijación

Las muestras de tejido fueron fijadas en formalina tamponada al 10% (Panreac, Barcelona) durante 48 horas a temperatura ambiente y posteriormente mantenidas en alcohol etílico al 70% hasta su procesamiento.

Prosección

Una vez fijadas, se tomó como referencia para su inclusión y procesamiento el hilo de sutura (que marca un punto estandarizado para todas las muestras a 3 cm desde el borde más inferior del colgajo), desde el cual tomamos un centímetro hacia el borde más próximo al pedículo y otro centímetro hacia el borde más distal al pedículo, el cual se marca con tinta china negra para poderlo diferenciar en el estudio microscópico ulterior. Posteriormente realizamos un corte longitudinal a lo largo de la pieza desde la epidermis hasta seccionar la pieza en dos fragmentos, quedando la zona marcada con hilo en mitad del fragmento a estudio y uno de los bordes tintado de negro (figura 22).

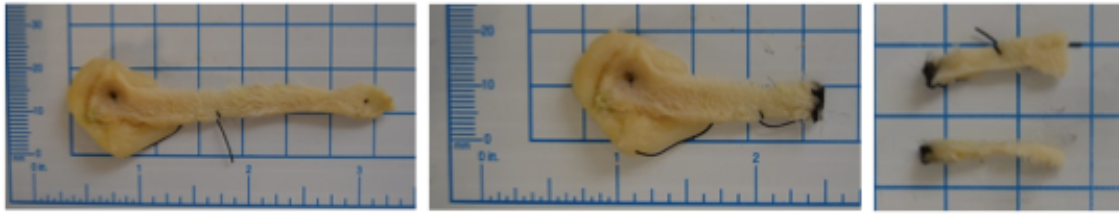


Figura 22. Prosección de la muestra. Izquierda: muestra completa tras fijación. Centro: corte del extremo distal del colgajo a 1 cm del hilo de sutura y tinción del mismo. Derecha: corte del extremo proximal del colgajo a 1 cm del hilo de sutura y corte longitudinal de la muestra para su estudio.

Inclusión y confección de bloques de parafina.

Los fragmentos de tejido cutáneo de rata fueron introducidos debidamente etiquetados en “cassetes” de plástico (Casa Álvarez, Madrid, España) en un procesador automático de tejidos Excelsior ES (Thermo Scientific, CA, USA) para ser embebidos en parafina según el protocolo del departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Cada una de las muestras fue orientada adecuadamente y fueron confeccionados 2 bloques de parafina con el tejido embebido en la misma sustancia por cada rata en una estación de montaje con dosificador de parafina caliente y placa fría a 4°C modelo EC350 (Casa Álvarez, Madrid, España).

Corte y tinción

Tras confeccionar un bloque de parafina las muestras fueron cortadas mediante un micrótopo de rotación (Microm) a 4 micras de espesor. Las secciones tisulares fueron

recogidas en baño de flotación, depositados sobre portaobjetos y secados en estufa a 37°C durante 24 horas. Tras el secado las secciones tisulares fueron teñidas con:

- Hematoxilina–Eosina: las secciones tisulares montadas sobre portas secados en estufa a 37°C durante 24 horas fueron introducidas sin desparafinar en un histoteñidor automático modelo Varistain Gemini (Thermo Shandon, CA, USA), siguiendo el protocolo establecido en el departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada (figura 23).
- Tricrómico de Masson: la tinción de tricrómico de Masson se realizó en un histoteñidor automático modelo ArtisanLink (Dako, Barcelona) con el Kit de Tricrómico de Masson (Dako, Barcelona, España) siguiendo el protocolo establecido por el kit (figura 23).

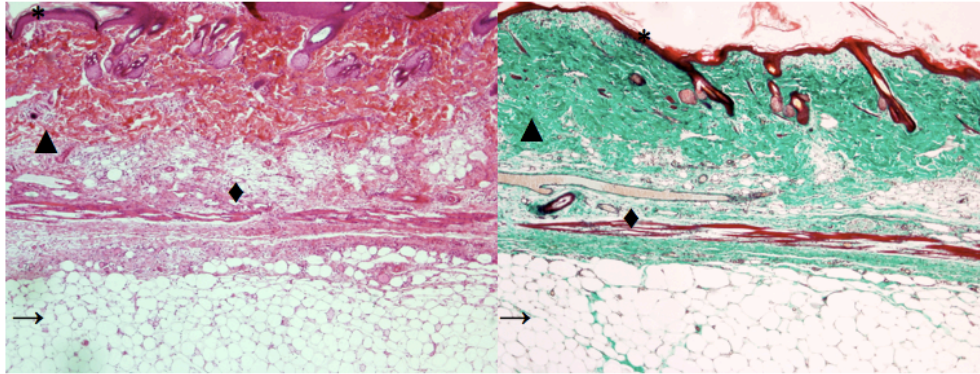


Figura 23. Diferentes tinciones utilizadas. Corte histológico de piel teñida con Hematoxilina-Eosina (izquierda) y Tricrómico de Masson (derecha). Se diferencia la epidermis (*), la dermis (papilar y reticular) (▲), la capa muscular (◆) y el tejido celular subcutáneo (→). Magnificación original x4.

Valoración de las tinciones.

Para el estudio histológico de las muestras se realizó una valoración semicuantitativa de toda la pieza (2 cm), en la que se estudiaron varios parámetros según su intensidad (leve/moderado/intenso). Los parámetros estudiados según su intensidad son el edema a lo largo de la pieza (figura 24) y el infiltrado inflamatorio a nivel del marcaje realizado intraoperatoriamente con un hilo (figura 25).

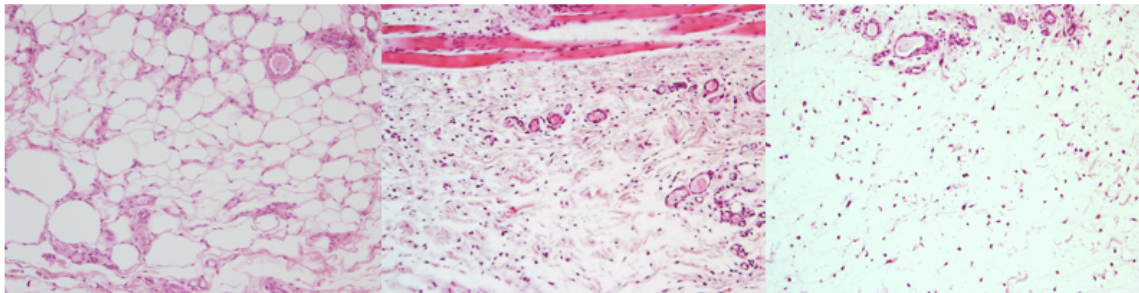


Figura 24. Diferentes grados de edema. Edema leve (izquierda): dispersión de los elementos celulares sin desvirtuarse el patrón arquitectural del tejido. Edema moderado (centro). Edema intenso (derecha): células más separadas por el aumento de líquido intersticial con desaparición del patrón tisular. Hematoxilina-Eosina, magnificación original x10.

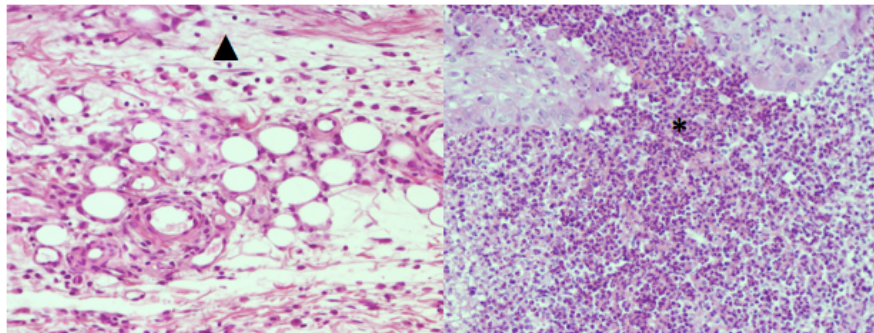


Figura 25. Diferentes grados de infiltrado inflamatorio. Infiltrado inflamatorio de intensidad leve/moderada (derecha) con predominio de linfocitos y células plasmáticas (▲). Infiltrado inflamatorio severo (izquierda) con predominio de leucocitos polimorfonucleares (*). Hematoxilina-Eosina, magnificación original x20.

A continuación, se llevó a cabo una valoración cuantitativa para la medición de vasos neoformados en la zona bajo el hilo de sutura, utilizando para su estudio la tinción de Tricrómico de Masson (figura 26). Para la medición de los vasos neoformados decidimos estudiar el tejido adiposo bajo la muscular. Se utilizó un microscopio OLYMPUS (Olympus Optical Company, Ltd., Tokyo, Japón) modelo BH-2 con un objetivo de 40x y con un ocular milimetrado (Eye piece, OLYMPUS) en el que se contabilizaron las estructuras vasculares existentes dentro de las cuadrículas. Posteriormente, los resultados obtenidos fueron divididos por el factor corrector para un objetivo de 40x (0,062), pudiendo así estimar el número real de vasos por mm².

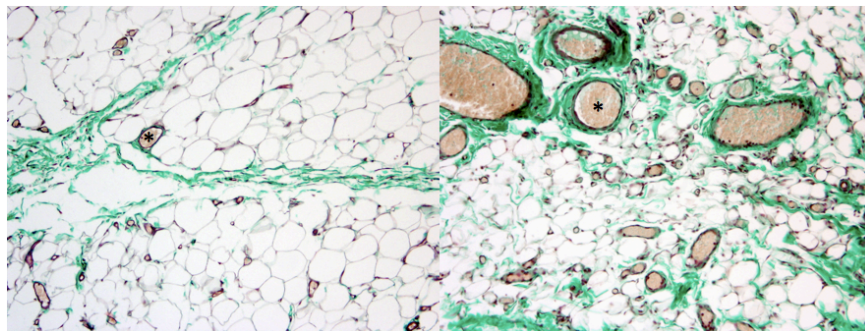


Figura 26. Neoformación de vasos (*) en el tejido celular subcutáneo. Ligera neovascularización (derecha) e intensa (izquierda). Tricrómico de Masson, magnificación original x20.

10. Determinación de parámetros bioquímicos

10.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS: HOMOGENIZADO

Cada uno de los tejidos se homogeneizó con un homogeneizador de vástago añadiendo 4 ml de tampón fosfato potásico 0,1M pH 7,4 a la muestra de piel de rata completa. El tampón se obtuvo a partir de la mezcla de K_2HPO_4 0,1 M y KH_2PO_4 0,1 M.

Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos para posteriormente recoger el sobrenadante, que fue distribuido en 3 alícuotas de 1 ml cada una:

- A la primera de ellas, se le añadió 0,1 ml de ácido perclórico (PCA) al 70 %, para la precipitación de las proteínas. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue congelado a -80 °C hasta el momento de su uso para realizar el análisis de GSH y MDA(figura 27).
- Las dos alícuotas restantes, se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se repartió en diferentes alícuotas, siendo congelado a -80 °C, para la determinación de la concentración de proteína y de la actividad enzimática SOD (figura 27).

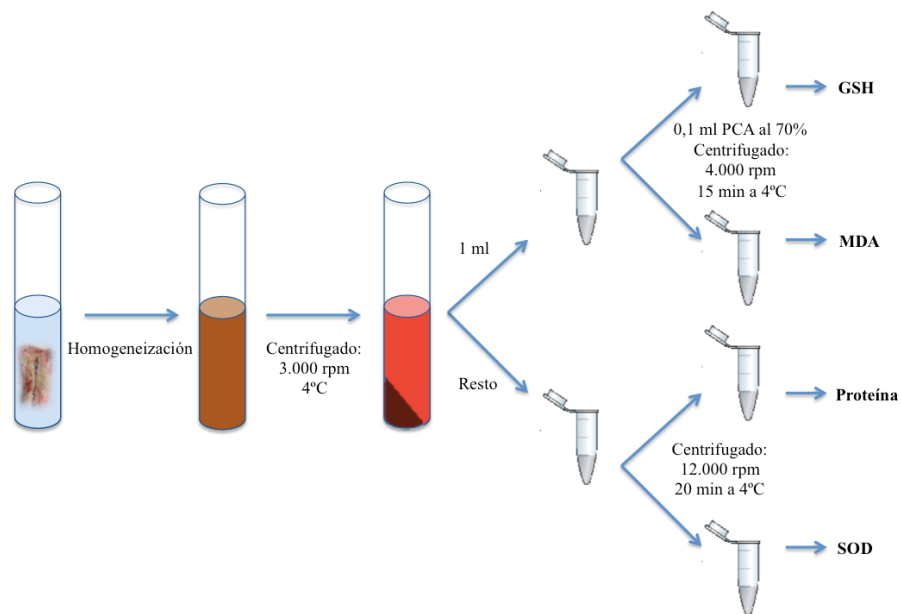


Figura 27. Esquema del procesamiento de las muestras.

10. 2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

La manipulación de todas las muestras se llevó a cabo a 4 °C, a fin de minimizar las posibles degradaciones bioquímicas.

10. 2. 1. Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método propuesto por Bradford²⁷⁸ en 1976. Este método se basa en el cambio de color que experimenta el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 en medio ácido en presencia de

proteínas. Éstas producen el cambio de la coloración anaranjada del reactivo a una tonalidad azulada, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas.

El procedimiento aplicado fue el siguiente (tabla 2):

- A partir de una solución madre de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 0,1 mg/ml en agua destilada, se realizaron diferentes diluciones para conseguir una recta patrón que comprendiese concentraciones de 0 a 100 µg/ml de BSA, lo cual se consiguió depositando diferentes volúmenes de solución madre en los pocillos y completando con agua mili-Q.
- A continuación se preparó una dilución 1:40 de los sobrenadantes de las muestras en el mismo tampón en el que se realizó el homogeneizado (tampón fosfato potásico 0,1M pH 7,4). Se depositaron 5 µl de estas diluciones en cada pocillo de la placa (3 pocillos por cada muestra) y se completaron con 45 µl de agua mili-Q.
- Para finalizar se añadieron 140 µl de reactivo de Bradford a cada pocillo y se dejó reaccionar durante 15 min en agitación. Tras ese tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia a una $\lambda = 595$ nm.

	St0	St1	St2	St3	St4	Muestra
BSA	-	5	25	40	50	-
Muestra	-	-	-	-	-	5
Agua mili-Q	50	45	25	10	-	45
Reactivo Bradford	140	140	140	140	140	140
mg/ml	0	0,01	0,05	0,08	0,1	-

Tabla 2. Cantidades y orden de adición de reactivos para la determinación de proteínas. Volúmenes en µl. St: estándar, BSA: albúmina sérica bovina.

10. 2. 2. Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)

La determinación del GSH se realizó mediante el protocolo de Hissin y Hilf²⁷⁹ adaptado. Para ello se utilizó una alícuota del sobrenadante preparado como se explica en el aparatado de homogeneización de muestras.

- Reactivos:
 - Tampón fosfato sódico 0,1 M pH 8.
 - Ácido ortoftaldehído (OPA) en metanol 1 mg/ml.

- Procedimiento:
 - A partir de una solución madre de GSH a una concentración de 4 mM en ácido perclórico (PCA), se realizaron diferentes diluciones para conformar la recta patrón que comprendiese concentraciones de 2,5 a 320 μ M de GSH. Las diferentes muestras y la recta patrón fueron dispuestas en cada pocillo de la placa de 96 pocillos (2 pocillos para cada punto de la recta patrón y por cada muestra), así como los distintos reactivos en las cantidades descritas a continuación (Tabla 3).

	St0	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St7	St8	Muestra
Agua miliQ	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSH	-	10	10	10	10	10	10	10	10	-
Muestra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Tampón pH8	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
OPA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
nmoles/muestra	0	0,125	0,250	0,5	1	2	4	8	16	-

Tabla 3. Cantidades y orden de adición de reactivos para realizar el análisis de GSH. Volúmenes en μl . St: estándar, GSH: glutatión reducido, OPA: ácido ortoftaldehído.

- A continuación se mantuvo la placa en completa oscuridad durante 45 min, transcurrido este período de tiempo, se procedió a la medida de la fluorescencia en un lector de placas a una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 425 nm.

10. 2. 3. Determinación de la concentración de malonildialdehído (MDA)

Para la determinación del MDA, se utilizó el método colorimétrico propuesto por Recknagel²⁸⁰ en 1982 adaptándolo a una microplaca de 96 pocillos. Es un método indirecto que detecta los productos de degradación de lípidos (aldehídos y MDA) basado en que dos moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de MDA para formar un cromóforo que absorbe a una $\lambda=550$ nm.

- Reactivos:
 - Malonildialdehído (MDA) 6 M.
 - Ácido tricloroacético (TCA) 20%.
 - Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%.

- Procedimiento:
 - A partir de una solución madre de MDA 6 M, se realizaron sucesivas diluciones para elaborar la recta patrón (de 0,23 a 2,3 μ M de MDA).
 - Las diferentes muestras y la recta patrón fueron dispuestas en tubos de ensayo (2 tubos para cada punto de la recta patrón y 3 tubos por cada muestra), así como los distintos reactivos en las cantidades descritas a continuación (tabla 4).

	Blanco	St1	St2	St3	St4	St5	Muestra
Agua mili-Q	50	45	40	30	10	-	-
MDA 20 μ M	-	5	10	20	40	50	-
Muestra	-	-	-	-	-	-	50
TCA	125	125	125	125	125	125	125
TBA	250	250	250	250	250	250	250
Nmoles/muestra	-	0,1	0,2	0,4	0,8	1	-

Tabla 4. Cantidades y orden de adición de reactivos para realizar el análisis de MDA. Volúmenes en μ l. St: estándar, MDA: malonildialdehído, TCA: ácido tricloroacético, TBA: ácido 2-tiobarbitúrico.

- Tras la adición del TBA, se procedió a la incubación de los tubos tapados (para evitar la evaporación) y recubiertos de papel de aluminio (para evitar la incidencia de luz) a 80 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, y una vez fríos, se depositaron 200µl de cada tubo en la placa para su lectura a una $\lambda=540$ nm.

10. 2. 4. Determinación de la concentración de superóxido dismutasa (SOD).

La SOD cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). Esta actividad se midió con el *SOD Assay Kit-WST* (Sigma-Aldrich). El fundamento del kit es el uso de la sal de tetrazolium WST, que en presencia de $O_2^{\cdot-}$ forma un compuesto que absorbe a 440nm. Dado que la absorbancia a $\lambda=440$ nm es proporcional a la cantidad de $O_2^{\cdot-}$. La actividad SOD puede ser cuantificada como inhibición de la reacción de desarrollo de color a $\lambda=440$ nm.

10. Análisis estadístico

Las variables analizadas estadísticamente así como sus unidades de medida y puntuación, se exponen a continuación en las siguientes tablas:

Parámetros clínicos	
VARIABLE	UNIDAD
Supervivencia	%

Tabla 5. Clasificación de las variables estudiadas para la valoración de los parámetros clínicos.

Parámetros anatomopatológicos	
VARIABLE	PUNTUACIÓN/UNIDAD
Edema	1-3
Infiltrado inflamatorio	1-3
Neovascularización	vasos/mm ²

Tabla 6. Clasificación de las variables estudiadas para la valoración de los parámetros anatomopatológicos.

Parámetros bioquímicos	
VARIABLE	UNIDAD
Concentración de Glutación reducido (GSH)	nmol/mg de proteína
Concentración de Malonildialdehido (MDA)	nmol/mg de proteína
Concentración de Superóxido dismutasa (SOD)	U/mg de proteína

Tabla 7. Clasificación de las variables estudiadas para la valoración de los parámetros bioquímicos.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS inc., Chicago, Illinois). Se determinó la normalidad de las diferentes variables estudiadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para establecer las diferencias entre grupo en las variables que presentaban una distribución normal se empleó un test paramétrico ANOVA unifactorial, seguido de un test de Tukey para determinar las diferencias entre cada par de grupos. Las variables que presentaban una distribución no normal fueron analizadas mediante un estudio no paramétrico empleando el test de Kruskal-Wallis, seguido de un test de U de Mann-Whitney. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

11. Soporte bibliográfico

Las búsquedas bibliográficas han sido realizadas en internet a través de las bases de datos PubMed (U.S. National Library of Medicine and the Nacional Institutes of Health) y ScienceDirect (Elsevier, Ámsterdam, The Netherlands).

Los artículos originales fueron obtenidos a través del Servicio de Biblioteca Virtual Sanitaria de Extremadura (www.saludteca.gobex.es) y de la Red de Bibliotecas del Sistema Sanitario Público de Extremadura.

12. Tratamiento informático

Todos los datos referentes al estudio se trataron en un ordenador Macintosh compatible con microprocesador 1.86 GHz Intel Core 2 Duo utilizando el siguiente software:

- Como sistema operativo: Mac OS X 10.6.8.
- Como procesador de textos: Microsoft® Word 2011 para Mac.
- Como editor de hojas de cálculo: Microsoft® Excel 2011 para Mac.
- Como gestor de base de datos: Microsof® Access 2011 para Mac.
- Como programa para tratamiento de imágenes: ImageJ 1.47 para Mac.
- Como programa gestor de bibliografía: Papers 2.6.4 para Mac.
- Como programa estadísticos para tratamiento y análisis posterior de los datos: IBM SPSS 15.0 para Windows (SpSS inc., Chicago, Illinois).

14. Ética y legislación de los animales de laboratorio

Durante el presente trabajo experimental se han tenido en cuenta los principios rectores básicos, de carácter internacional, aplicables a las investigaciones biomédicas con animales. Estas directrices están recogidas en la normativa española Real Decreto 1201/2005, incluida en éste decreto según la directiva 86/609 de la Comunidad Europea para la utilización de animales de experimentación. Este Real Decreto regula, entre otros aspectos, las condiciones en que se pueden utilizar animales de experimentación, el registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación, los requisitos de las instalaciones y equipos de los mismos, tanto humanos, con especial hincapié en cuál debe ser su formación, como materiales.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

A continuación describimos los resultados obtenidos de nuestro estudio experimental. En primer lugar valoraremos los resultados de cada variable para los distintos grupos y, posteriormente, se presentarán los distintos estudios comparativos de utilidad para extraer las conclusiones.

En primer lugar valoraremos el aspecto clínico de los colgajos mediante la supervivencia de los mismos, expresada con la media \pm desviación estándar. En la tabla 8, se observa una supervivencia media ligeramente inferior en el grupo sometido a la isquemia de 8 horas sin intervención terapéutica (grupo 1) respecto al grupo con elevación del colgajo sin daño isquémico (grupo 0). También se aprecia un aumento de la supervivencia en los grupos con diferentes tratamientos frente al síndrome por IR (grupos 2, 3 y 4) comparado con el grupo sin tratamiento (grupo 1).

Variable	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
% Supervivencia	100 \pm 0	94,1 \pm 9,7	98,0 \pm 4,6	97,1 \pm 3,7	98,2 \pm 3,6

Tabla 8. Resultados de los parámetros clínicos para cada uno de los grupos.

Se observa un aumento del daño tisular mediante inflamación (expresado como aumento del edema e infiltrado inflamatorio) en los grupos sometidos a IR comparado con el grupo 0, donde exclusivamente se realiza la elevación del colgajo. En cambio, la neovascularización es más intensa en los grupos sometidos a isquemia, encontrándose su valor más alto en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (grupo 2). Los

resultados de los parámetros anatomopatológicos se expresan con la mediana en el caso del edema dermoepidérmico y con la media de los vasos/mm² en el caso de la neovascularización (tabla 9).

Variable	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Edema dermoepidérmico	1	2	1	1	2
Infiltrado inflamatorio	1	2	2	2	2
Neovascularización (vasos/mm ²)	142,5	169,4	276,2	211,5	200,7

Tabla 9. Resultados de los parámetros anatomopatológicos para cada uno de los grupos de estudio.

Respecto a los parámetros bioquímicos, en los grupos sometidos a un daño por IR (grupos 1, 2, 3 y 4) podemos apreciar cambios bioquímicos que compatibles con un aumento del estrés oxidativo comparados con el grupo 0, expresados como un descenso de los niveles de GSH, aumento de MDA y disminución de SOD (tabla 10). Los resultados se expresan mediante la media \pm desviación estándar.

Variable	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
GSH (nmol/mg proteína)	80 \pm 0,10	0,78 \pm 0,11	0,72 \pm 0,11	0,63 \pm 0,20	0,69 \pm 0,14
MDA (nmol/mg proteína)	75,58 \pm 10,57	86,11 \pm 32,86	115,03 \pm 34,34	119,14 \pm 33,92	126,10 \pm 29,49
SOD (U/mg proteína)	126,79 \pm 37,91	101,24 \pm 52,32	78,53 \pm 42,90	79,69 \pm 31,95	78,68 \pm 27,94

Tabla 10. Resultados de los parámetros bioquímicos para cada uno de los grupos de estudio.

1. Resultados en los grupos sin tratamiento

En este apartado compararemos los resultados obtenidos en los colgajos del grupo control (grupo 0), que no fueron sometidos a IR, frente a los colgajos que fueron sometidos a un período de isquemia de 8 horas (grupo 1).

Resultados clínicos

Respecto a los valores clínicos de supervivencia media del colgajo (tabla 11), se aprecia una disminución del área de supervivencia del 94,1 % en los colgajos del grupo 1 respecto al 100% de supervivencia en el grupo 0, siendo esta diferencia no significativa estadísticamente.

Variable	Grupo 0	Grupo 1	p
% Supervivencia	100 \pm 0	94,1 \pm 9,7	0,119

Tabla 11. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo control (Grupo 0) y en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1).

Resultados anatomopatológicos

El análisis de los resultados histopatológicos aprecia un aumento significativo del edema y del infiltrado inflamatorio en el grupo sometido a 8 horas de isquemia (grupo 1) frente al grupo sin daño isquémico (grupo 0). En cuanto a la neovascularización, se

encuentra un aumento de la misma en el grupo sometido a IR respecto al grupo (tabla 12).

Variable	Grupo 0	Grupo 1	p
Edema dermoepidérmico	1	2	0,002
Infiltrado inflamatorio	1	2	0,012
Neovascularización (vasos/mm ²)	142,5	169,4	0,276

Tabla 12. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo control (Grupo 0) y en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1).

Resultados bioquímicos

Respecto a los parámetros bioquímicos analizados (tabla 13), no hemos obtenido significancia estadística en el comportamiento de estas variables al comparar el grupo 0 con el grupo al que se aplicó las 8 horas de isquemia para la inducción del síndrome de IR (grupo 1). No obstante, podemos apreciar que la aplicación de isquemia en nuestras condiciones experimentales provocan cambios bioquímicos que concuerdan con un aumento del estrés oxidativo en el grupo 1, expresados como un descenso de los niveles de GSH, aumento de MDA y disminución de SOD (tabla 7).

Variable	Grupo 0	Grupo 1	p
GSH (nmol/mg proteína)	0,80 ± 0,10	0,78 ± 0,11	0,994
MDA (nmol/mg proteína)	75,58 ± 10,57	115,03 ± 34,34	0,931
SOD (U/mg proteína)	126,79 ± 37,91	78,53 ± 42,90	0,603

Tabla 13. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo control (Grupo 0) y en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1).

2. Resultados en los grupos con tratamiento

A continuación, expondremos los resultados obtenidos en los colgajos del grupo de IR sin tratamiento (grupo 1) frente a los distintos grupos de tratamiento: preconditionamiento (grupo 2), C1-INH (grupo 3) y ambos de manera conjunta (grupo 4).

2.1. RESULTADOS TRAS LA APLICACIÓN DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Resultados clínicos

Apreciamos un aumento de la supervivencia media de los colgajos en el grupo tratado con el protocolo de preconditionamiento isquémico (grupo 2) respecto al grupo 1, no siendo significativo estadísticamente (tabla 14).

Variable	Grupo 1	Grupo 2	p
% Supervivencia	94,1 ± 9,7	98,0 ± 4,6	0,494

Tabla 14. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2).

Resultados anatomopatológicos

En el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (grupo 2) se observa una mayor neoformación de vasos respecto al grupo no tratado (grupo 1), diferencia estadísticamente significativa. También se aprecia una diferencia no significativa respecto al edema dermoepidérmico, siendo menor en el grupo tratado que en el grupo 1 (tabla 15).

Variable	Grupo 1	Grupo 2	p
Edema dermoepidérmico	2	1	0,138
Infiltrado inflamatorio	2	2	0,786
Neovascularización (vasos/mm ²)	169,4	276,2	0,004

Tabla 15. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2).

Resultados bioquímicos

El preconditionamiento isquémico implica un daño por estrés oxidativo de carácter repetitivo por la acción de los RLO producidos en cada reperusión. Las diferencias encontradas entre el grupo sometido al tratamiento con preconditionamiento isquémico (grupo 2) y el grupo 1 en los parámetros bioquímicos no alcanzaron significancia estadística (tabla 16). A pesar de ello, podemos observar un mayor estrés

oxidativo (↓ GSH, ↑ MDA, ↓ SOD) en el grupo 2, explicable por la reperusión repetida que implica la técnica de reperusión.

Variable	Grupo 1	Grupo 2	p
GSH (nmol/mg proteína)	0,78 ± 0,09	0,72 ± 0,11	0,880
MDA (nmol/mg proteína)	86,11 ± 32,86	115,03 ± 34,34	0,205
SOD (U/mg proteína)	101,24 ± 52,32	78,53 ± 42,90	0,702

Tabla 16. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (Grupo 2).

2.2. RESULTADOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DEL C1-INH

Resultados clínicos

La administración de C1-INH en el grupo 3 propició un aumento en el porcentaje medio de supervivencia (tabla 17). Se observa una supervivencia media del 97,1% en el grupo tratado con C1-INH frente a 94,1 en el grupo sin tratamiento (grupo 1), sin obtener significancia estadística.

Variable	Grupo 1	Grupo 3	p
% Supervivencia	94,1 ± 9,7	97,1 ± 3,7	0,719

Tabla 17. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).

Resultados anatomopatológicos

Se observa un mayor índice de neovascularización, no estadísticamente significativa, en el grupo tratado con C1-INH (grupo 3) comparado con el grupo 1. También se aprecia una disminución del edema en el grupo 3, siendo no significativa estadísticamente.

Variable	Grupo 1	Grupo 3	p
Edema dermoepidérmico	2	1	0,166
Infiltrado inflamatorio	2	2	0,122
Neovascularización (vasos/mm ²)	169,4	211,5	0,083

Tabla 18. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).

Resultados bioquímicos

El análisis de los resultados bioquímicos no encuentran diferencia significativa entre el grupo tratado con C1-INH (grupo3) y el grupo sin tratamiento (grupo 1), (tabla

19). En nuestras condiciones experimentales, no podemos afirmar que el C1-INH aporte un beneficio en el tratamiento del síndrome por IR respecto a los parámetros bioquímicos.

Variable	Grupo 1	Grupo 3	p
GSH (nmol/mg proteína)	0,78 ± 0,09	0,63 ± 0,20	0,136
MDA (nmol/mg proteína)	86,11 ± 32,86	119,14 ± 33,92	0,110
SOD (U/mg proteína)	101,24 ± 52,32	79,69 ± 31,95	0,741

Tabla 19. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).

2.3. RESULTADOS TRAS EL TRATAMIENTO CONJUNTO DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y C1-INH

Resultados clínicos

El análisis de los resultados en supervivencia media de los colgajos mostró un aumento de los valores en el grupo tratado de manera combinada con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (98,2 %) respecto al grupo 1 (94,1%), sin alcanzar significancia estadística ($p=0,466$). (Tabla 20).

Variable	Grupo 1	Grupo 4	p
% Supervivencia	94,1 \pm 9,7	98,2 \pm 3,6	0,466

Tabla 20. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo de isquemia reperusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

Resultados anatomopatológicos

El nivel de neovascularización observado en el grupo tratado con preacondicionamiento y C1-INH asociado (grupo 4) es menor respecto al grupo sin tratamiento para el síndrome de IR (grupo 1), siendo esta diferencia no significativa estadísticamente. En el resto de parámetros anatomopatológicos no se observan diferencias (tabla 21).

Variable	Grupo 1	Grupo 4	p
Edema dermoepidérmico	2	2	0,936
Infiltrado inflamatorio	2	2	0,451
Neovascularización (vasos/mm ²)	169,4	200,7	0,134

Tabla 21. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo de isquemia reperfusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

Resultados bioquímicos

Al valorar los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo encontramos un aumento significativo ($p=0,032$) de los niveles de MDA en el grupo tratado de forma combinada con preconditionamiento isquémico y C1-INH (126,10 nmol/mg) respecto del grupo sin tratamiento (86,11 nmol/mg). Las diferencias encontradas en el resto de parámetros bioquímicos no alcanzaron significancia estadística (tabla 22).

Los datos obtenidos concuerdan de nuevo con un aumento del estrés oxidativo (↓ GSH, ↑ MDA, ↓ SOD) que puede estar en relación con la reentrada repetida de polimorfonucleares que producirán RLO, asociado a la técnica de preconditionamiento isquémico.

Variable	Grupo 1	Grupo 4	p
GSH (nmol/mg proteína)	0,78 ± 0,09	0,69 ± 0,14	0,606
MDA (nmol/mg proteína)	86,11 ± 32,86	126,10 ± 29,49	0,032
SOD (U/mg proteína)	101,24 ± 52,32	78,68 ± 27,94	0,707

Tabla 22. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo de isquemia reperfusión con 8 horas de isquemia (Grupo 1) y en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

3. Comparativa de las distintas opciones terapéuticas estudiadas

Por último, expresaremos el estudio comparativo de los resultados de los distintos de grupos de intervención del estudio: preacondicionamiento (grupo 2), C1- INH (grupo 3) y ambos de manera conjunta (grupo 4).

3.1. TRATAMIENTO CON PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO VS C1-INH

Resultados clínicos

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de los colgajos entre el grupo tratado con el protocolo de preacondicionamiento isquémico (grupo 2) y el grupo tratado con C1-INH (grupo 3), (tabla 23).

Variable	Grupo 2	Grupo 3	p
% Supervivencia	98,0 ± 4,6	97,1 ± 3,7	0,996

Tabla 23. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).

Resultados anatomopatológicos

Se aprecia un mayor índice de neovascularización en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (grupo 2), respecto al grupo tratado con C1-INH (grupo 3), sin alcanzar significancia estadística (tabla 24). En el resto de parámetros anatomopatológicos no se observan diferencias.

Variable	Grupo 2	Grupo 3	p
Edema dermoepidérmico	1	1	0,833
Infiltrado inflamatorio	2	2	0,233
Neovascularización (vasos/mm ²)	276,2	211,5	0,073

Tabla 24. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).

Resultados bioquímicos

El análisis de las diferencias en los parámetros bioquímicos entre los grupos 2 y 3 no encontró ninguna diferencia significativa (tabla 25). Desde el punto de vista bioquímico y bajos nuestras condiciones experimentales, no podemos establecer la superioridad de ninguno de los tratamientos en el síndrome de IR.

Variable	Grupo 2	Grupo 3	p
GSH (nmol/mg proteína)	0,72 ± 0,11	0,63 ± 0,20	0,596
MDA (nmol/mg proteína)	115,03 ± 34,34	119,14 ± 33,92	0,998
SOD (U/mg proteína)	78,53 ± 42,90	79,69 ± 31,95	1,000

Tabla 25. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3).

3.2. TRATAMIENTO CON PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO VS TRATAMIENTO CONJUNTO DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y C1-INH

Resultados clínicos

La comparación del porcentaje de supervivencia media de los colgajos no señalan ninguna diferencia significativa entre los resultados de los animales sometidos al tratamiento con preacondicionamiento isquémico exclusivamente, y los de los animales que recibieron el tratamiento combinado de preacondicionamiento más C1-INH (tabla 26).

Variable	Grupo 2	Grupo 4	p
% Supervivencia	98,0 ± 4,6	98,2 ± 3,6	1,000

Tabla 26. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

Resultados anatomopatológicos

Respecto a los parámetros anatomopatológicos (tabla 27), se observa un aumento significativo en neovascularización en el grupo tratado con preconditionamiento exclusivamente (grupo 2) respecto al grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH combinado (grupo 4).

Variable	Grupo 2	Grupo 4	p
Edema dermoepidérmico	1	2	0,219
Infiltrado inflamatorio	2	2	0,720
Neovascularización (vasos/mm ²)	276,2	200,7	0,042

Tabla 27. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

Resultados bioquímicos

No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en los parámetros bioquímicos (tabla 28), entre los resultados de los animales tratados exclusivamente con preconditionamiento isquémico (grupo 2) y aquellos tratados de forma combinada con preconditionamiento y C1-INH (grupo 4).

Variable	Grupo 2	Grupo 4	p
GSH (nmol/mg proteína)	0,72 ± 0,11	0,69 ± 0,14	0,987
MDA (nmol/mg proteína)	115,03 ± 34,34	126,10 ± 29,49	0,918
SOD (U/mg proteína)	78,53 ± 42,90	78,68 ± 27,94	1,000

Tabla 28. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico (Grupo 2) y en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

3.3. TRATAMIENTO CON C1-INH VS TRATAMIENTO CONJUNTO DE PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y C1-INH

Resultados clínicos

No se encuentran diferencias significativas a nivel clínico al comparar el grupo tratado exclusivamente con C1-INH con el grupo tratado de forma combinada con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (tabla 29).

Variable	Grupo 3	Grupo 4	p
% Supervivencia	97,1 ± 3,7	98,2 ± 3,6	0,992

Tabla 29. Resultados de los parámetros clínicos en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3) y en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

Resultados anatomopatológicos

Respecto a los parámetros anatomopatológicos y bajo nuestras condiciones experimentales, no encontramos diferencias significativas entre los grupos 3 y 4 (tabla 30).

Variable	Grupo 3	Grupo 4	p
Edema dermoepidérmico	1	2	0,261
Infiltrado inflamatorio	2	2	0,335
Neovascularización (vasos/mm ²)	211,5	200,7	0,656

Tabla 30. Resultados de los parámetros anatomopatológicos en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3) y en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

Resultados bioquímicos

Bajo nuestras condiciones experimentales, no se aprecian diferencias significativas en los resultados bioquímicos entre el grupo tratado con el protocolo de preacondicionamiento isquémico y el grupo tratado de forma combinada con preacondicionamiento más C1-INH (tabla 31).

Variable	Grupo 3	Grupo 4	p
GSH (nmol/mg proteína)	0,63 ± 0,20	0,69 ± 29,49	0,873
MDA (nmol/mg proteína)	119,14 ± 33,92	126,10 ± 29,49	0,984
SOD (U/mg proteína)	79,69 ± 31,95	78,68 ± 27, 94	1,000

Tabla 31. Resultados de los parámetros de estrés oxidativo en el grupo tratado con C1-INH (Grupo 3) y en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico y C1-INH (Grupo 4).

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Discusión del método experimental de investigación

El modelo de IR en colgajo epigástrico de rata está ampliamente representado en la bibliografía. Las ventajas de este modelo son la similitud fisiopatológica con el ser humano, además de su fácil reproducibilidad y rápida ejecución.

A continuación pasamos a discutir de forma ordenada los distintos aspectos metodológicos del estudio.

1.1. ANIMAL DE ESTUDIO: RATA WISTAR

La rata Wistar, perteneciente a la especie *Rattus Norvegicus*, es actualmente una de las cepas más utilizadas en los proyectos de investigación experimental. Esta variedad fue desarrollada en el Instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación médica y biológica, y es sobre todo la primera cepa de rata desarrollada para servir como organismo modelo en un momento en que los laboratorios utilizaban principalmente ratones caseros comunes. Más de la mitad de todas las cepas de ratas de laboratorio son descendientes de la colonia original establecida por el fisiólogo Henry Donaldson, el científico administrador Milton J. Greenman, y el investigador/embriólogo Helen Dean Rey.

La rata Wistar se caracteriza por su gran cabeza, orejas largas, y por tener una longitud de la cola que siempre es menor que la longitud del cuerpo. Y lo que la hace idónea para estudios de investigación es su vida media larga (3 años en laboratorio), la tasa de crecimiento, el tamaño medio y la docilidad y facilidad en su manipulación.

En nuestro estudio incluimos ratas Wistar macho con pesos entre 430 y 530 gramos, que se corresponde con edades entre 12 y 16 semanas de vida. Este rango de pesos nos ha permitido trabajar con ratas de un tamaño relativamente homogéneo con la flexibilidad de fechas que conlleva un período aproximado de un mes en el que las ratas podían mantenerse en el animalario. Por otra parte, una diferencia mayor de 100 gramos en dos ratas en las que le realizamos un colgajo idéntico (7 por 3 cm) puede afectar al resultado. En ratas más pequeñas el colgajo es proporcionalmente de mayor tamaño con vasos nutricios de menor calibre. Cabría predecir pues, un mayor daño por isquemia reperusión en los colgajos realizados en ratas de menor peso. Aunque un rango más estrecho de peso habría sido más adecuado, no consideramos que afecte de manera relevante a nuestros resultados puesto que los grupos tenían un reparto homogéneo en cuanto a los pesos de los animales.

Tal y como hemos comentado una de las características de estos animales es la docilidad que permite un fácil manejo de los mismos. No obstante, en fases previas a nuestro estudio observamos inconvenientes relacionados con el autocanibalismo, como dehiscencias de sutura o autofagias del colgajo. Para su prevención utilizamos diferentes medios restrictivos o disuasorios, como el uso de un collarín o diversos apósitos que resultaron ineficaces por insuficientes o por ausencia de tolerancia por parte del animal (figura 28).

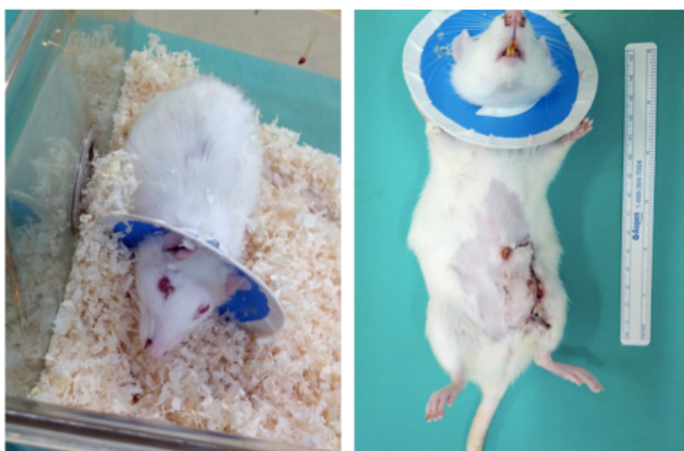


Figura 28. Experiencia con collarín: se aprecian signos de sufrimiento en los ojos y pelaje del animal(izquierda); autocanibalismo a pesar del uso de collarín (derecha).

Finalmente, obtuvimos un modelo de vendaje eficaz que limita ligeramente la flexión del tronco de la rata a la vez que establece una barrera entre la herida quirúrgica y la boca del animal (figuras 29 y 30). Consideramos dicho vendaje un dispositivo sencillo, que puede ser de utilidad para futuros estudios u otros grupos investigadores.



Figura 29. Manufactura y colocación del vendaje protector.



Figura 30. Rata del estudio al 7º día (recogida de muestras). Se observa el colgajo intacto y la porción abdominal del vendaje protector mordida.

1. 2. MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN

El colgajo cutáneo epigástrico de rata constituye un modelo experimental que simula de manera muy aproximada la reconstrucción de defectos tisulares mediante la transferencia de colgajos libres. Fue descrito anatómicamente en el año 1984 por Petry y Wortham²⁷⁶, y ha sido ampliamente utilizado como modelo de IR desde entonces. Es un colgajo versátil y de fácil ejecución que permite obstruir el flujo sanguíneo arterial, venoso o completo de manera controlada y reproducible.

En la literatura, el tamaño del colgajo varía desde los 4 a 7 cm en longitud y de 2,5 a 5 cm de ancho^{84,85,276,281-284}. En nuestro estudio, escogimos el mayor tamaño que permitían los límites anatómicos descritos para el colgajo epigástrico. En ninguno de los animales del estudio, el colgajo de 7 por 3 cm sobrepasó la línea media abdominal

medialmente, el reborde costal superiormente, la línea axilar anterior lateralmente y la base del pene inferiormente²⁸⁵. Una mayor dimensión del colgajo debe significar un mayor sufrimiento distal del mismo ante un daño de IR. Esto nos permitiría establecer un daño evidente en el grupo control sobre el cual fuera posible valorar los potenciales beneficios de nuestras actitudes terapéuticas.

En nuestro estudio utilizamos 8 horas de isquemia primaria seguidos de perfusión para establecer un daño por IR. Necesitamos un período de isquemia suficientemente elevado para producir un daño evidente sobre el que fuera posible estudiar el efecto positivo de nuestras intervenciones. Por otra parte, un tiempo de isquemia excesivo podría desembocar en la necrosis completa del colgajo impidiendo valorar efectos beneficiosos. La determinación de 8 horas de isquemia de nuestro estudio se basó en un trabajo de Kuo et al²⁸³. En este estudio, se define el porcentaje de supervivencia de los colgajos de 83%, 65%, 22% y 0% tras períodos de isquemia de 6, 8, 12 y 16 horas respectivamente. Parecía razonable pensar que un 65% de supervivencia del colgajo en el grupo control consistía en un daño evidente en el que sería posible valorar cambios con el tratamiento. No obstante, en nuestro estudio la media de porcentaje de supervivencia en el grupo control fue de $94,1 \pm 9,7 \%$. Encontrar beneficios estadísticamente significativos sobre un 94,1% de supervivencia media resulta difícil como discutiremos más adelante.

Otro aspecto a valorar respecto al modelo de IR utilizado en nuestro estudio es precisamente la técnica de inducción de la isquemia. En nuestro estudio realizamos una disección completa del colgajo epigástrico y su pedículo, continuando la disección hasta los vasos femorales. Para la inducción de isquemia aplicamos un clamp microvascular en

los vasos femorales proximal a la salida del mismo durante 8 horas. Preferimos utilizar los vasos femorales para la aplicación de la isquemia sobre los vasos espigástricos directamente por su mayor calibre. En los vasos de menor calibre se aumentan las posibilidades de causar un daño irreversible sobre estos tras la aplicación de la presión mantenida que supone un clamp. Además, distal a la salida de los vasos epigástricos se lleva a cabo la ligadura de los vasos femorales, con objeto de evitar el flujo retrógrado tras la aplicación del clamp microvascular.

La presión del clamp es determinada por la fuerza de clampado (en gramos), dividido por el área de la pared del vaso que es comprimida entre las ramas del clamp (en milímetros cuadrados). Así, cuanto menor es el área, mayor será esa presión ejercida sobre el vaso. La presión ejercida sobre los vasos seleccionados con el clamp empleado (tipo B-1, S&T AG[®]) es de 15 gr/mm². El clamp microvascular asegura efectividad en el mantenimiento de la isquemia para valores de presión arterial superiores a 200mmHg. Se decide aplicar el clamp sobre el vaso regional de mayor calibre posible (pedículo femoral), para minimizar los efectos de la presión mantenida^{284,286}, y no sobre el pedículo epigástrico superficial dado su pequeño calibre.

1.3. GRUPOS DE ESTUDIO

Un aspecto muy importante de la metodología de todo estudio experimental es la selección razonada de los distintos grupos de estudio. Por ese motivo, queremos hacer referencia a la justificación de cada uno de los mismos.

Grupo 0

Los animales pertenecientes a este grupo fueron sometidos a la disección del colgajo exclusivamente, sin sufrir daño por IR.

Como hemos comentado en la introducción de este trabajo, hay diversos factores que afectan a la viabilidad del colgajo. Todos los colgajos presentan cierto grado de sufrimiento por la agresión que constituye la disección del mismo y por la interrupción de circulación secundaria que también contribuye a la vascularización de ese segmento de tejido. En los casos en los que tanto la selección del colgajo para cada caso clínico, como el diseño y la ejecución son adecuados, el colgajo es capaz de superar la agresión que supone la cirugía.

Por ejemplo, el diseño del colgajo conforme al territorio vascular anatómico de los vasos epigástricos es esencial. En caso de que nuestro colgajo sobrepasara los límites anatómicos definidos para el colgajo epigástrico, encontraríamos un daño tisular derivado del diseño erróneo de mismo. Al igual que el diseño del colgajo, otros factores locales, sistémicos o derivados de la ejecución de la fase experimental podrían infligir un el daño tisular independiente al daño por IR.

Por todo lo anterior, el grupo 0 constituye un grupo esencial en el estudio. Los animales de este grupo nos permiten establecer el estado basal de nuestro colgajo, tanto a nivel macroscópico (porcentaje de supervivencia), como a nivel bioquímico y

anatomopatológico. Lo esperado y deseable en este grupo es confirmar la completa viabilidad del colgajo y la ausencia de estrés oxidativo y de datos inflamatorios, descartando otros factores diferentes a la IR como causantes de daño tisular en el resto de grupos de estudio.

Grupo 1

Los colgajos epigástricos de este grupo fueron sometidos a un daño por IR mediante una isquemia primaria de 8 horas.

Este grupo nos permite establecer la referencia del daño tisular generado en el colgajo epigástrico con nuestro modelo de isquemia reperusión. Respecto a este daño, podremos comparar el posible efecto beneficioso de las intervenciones terapéuticas del estudio: la técnica de preconditionamiento isquémico (grupo 2), la administración de C1-INH (grupo 3) y la combinación de ambas (grupo 4).

Grupo 2

En este grupo se pretende determinar el efecto beneficioso que tiene sobre nuestro modelo de IR una técnica ampliamente refrendada por la bibliografía como útil para minimizar los efectos del daño por isquemia reperusión: el preconditionamiento isquémico.

Como hemos explicado previamente, la aplicación de varios ciclos breves de IR desencadena una serie de mecanismos adaptativos que genera una mejor respuesta ante una isquemia primaria más prolongada⁷¹. Con este grupo queremos valorar la existencia de dicho beneficio y cuantificarla a través de las diferentes variables. Estos datos nos van a permitir establecer comparaciones con el grupo de estudio sin referencias bibliográficas en cuanto a su beneficio en el daño por IR en colgajos cutáneos: el grupo 3 (administración de C1-INH).

En nuestro estudio hemos sometido el colgajo a preconditionamiento isquémico mediante 3 ciclos de 10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de perfusión. Esta pauta nos parecía adecuada por su facilidad en la aplicación y reproducibilidad, así como por su eficacia descrita en la literatura^{160,287-290}. No obstante, otros autores han estudiado con resultados igualmente beneficiosos otros protocolos de preconditionamiento isquémico. Las distintas opciones varían en función de el número de ciclos de IR²⁹¹, al tiempo de cada ciclo, aplicando la técnica en el mismo colgajo o a distancia (preconditionamiento remoto)^{206,292} y usándola minutos antes de la isquemia primaria o días antes (preconditionamiento diferido)²⁰⁷.

Los efectos protectores de las diferentes técnicas de preconditionamiento, en cuanto a número y duración de ciclos, no ha sido establecidos. Algunos autores recomiendan 4 ciclos de IR de 5 minutos cada uno para un período de preconditionamiento total de 40 minutos^{293,294}. Mientras que otros, encuentran beneficios en la aplicación de una isquemia de 45 minutos seguida de 15 minutos de perfusión¹⁵⁹. Zahir et al demostró por primera vez las diferencias en cuanto al efecto protector de diferentes protocolos de preconditionamiento utilizando un modelo de colgajo muscular

de recto abdominal en rata. Concluyó que el preacondicionamiento con ciclos de 10 minutos es superior a usar ciclos de 5 minutos, y que 3 ciclos de IR era superior al uso de 1 o 2 ciclos exclusivamente²⁹⁵. Saita et al, confirma estos resultados con un estudio que compara el uso de 1 a 5 ciclos de 10 minutos y establece la superioridad del uso de 3 a 5 ciclos de isquemia respecto a 1 o 2 ciclos de isquemia reperusión²⁹¹.

Grupo 3

En este grupo analizaremos el efecto del C1-INH sobre nuestro modelo de IR. Tal y como se explicó en la introducción de este trabajo, éste fármaco ejerce su acción en la modulación de la activación de los sistemas de complemento y de contacto principalmente. Múltiples estudios experimentales defienden los efectos beneficiosos del C1-INH en el síndrome por isquemia reperusión en miocardio^{149,296}, músculo esquelético²⁶⁷, hígado^{127,269}, cerebro²⁷⁰ e intestino^{273,297}, sin embargo no está descrito aún el efecto del mismo sobre los colgajos fasciocutáneos.

Hemos utilizado la vía endovenosa como recomienda el fabricante y como se menciona en la bibliografía. La única vena a la que tenemos acceso desde nuestro campo quirúrgico sería la vena femoral ipsilateral al colgajo. No nos parecía adecuado utilizar esta vía venosa por arriesgar el retorno venoso de nuestro colgajo, pudiendo añadir un daño al mismo que no estuviera en relación con el síndrome por IR. En nuestro estudio hemos elegido la vena lateral de la cola de la rata como vía venosa, por ser una vía de fácil acceso. Además, permite monitorizar a simple vista la ausencia de extravasación del fármaco sin la necesidad de crear un nuevo abordaje quirúrgico.

La dosis de C1-INH empleada es variable en los distintos estudios publicados. Distintos autores han utilizado, obteniendo resultados positivos, concentraciones de 40 UI/kg en miocardio²⁹⁶, 50 UI/kg en cerebro²⁷⁰, 100UI/kg en músculo esquelético²⁶⁷, en intestino²⁷³ y en hígado²⁶⁹, así como 200 UI/kg en intestino²⁷³ e hígado¹²⁷. La dosis empleada en nuestro estudio fue de 100 UI/kg de rata, utilizando como referencia la dosis más repetida en la bibliografía.

En la mayoría de los estudios mencionados se administra el C1-INH previo a la reperfusión de los diferentes tejidos. No obstante, Heijnen describe un mayor efecto beneficioso del uso del C1-INH, cuando se éste se administra previo a la isquemia respecto a la administración pre-reperfusión¹²⁷. Sin duda es un dato muy interesante que sería útil valorar en futuros estudios.

Grupo 4

Por último, diseñamos un grupo que combinara las dos intervenciones terapéuticas utilizadas en el estudio: preconditionamiento isquémico y C1-INH. Consideramos interesante la posibilidad de analizar la magnitud del beneficio utilizando ambos tratamientos respecto al uso aislado de cualquiera de ellos.

1.4. APLICABILIDAD DEL ESTUDIO

El daño por IR explica la mayoría de las pérdidas o necrosis, parciales principalmente, de los colgajos microquirúrgicos. Para los pacientes, este tipo de complicación es un evento traumático que añade morbilidad al proceso además de suponer un mayor gasto sanitario por la necesidad de ingresos prolongados y nuevas cirugías. Ampliar el conocimiento en el daño de isquemia-perfusión y el desarrollo de técnicas que minimicen los efectos nocivos del mismo constituiría un aumento de éxitos en el campo de la cirugía reconstructiva. En este sentido, el C1-INH, podría suponer una estrategia terapéutica a valorar en el futuro si estudios como el nuestro avalan su eficacia.

Por otra parte, el C1-INH en su papel como inhibidor del complemento podría demostrar beneficios en alotrasplantes de tejido compuesto reduciendo la incidencia de rechazo hiperagudo. En los últimos años se ha avanzado mucho desde el punto de vista quirúrgico en este campo, con la realización de varios trasplantes de cara²⁹⁸⁻³⁰⁰, de miembro superior³⁰¹ y más recientemente de ambos miembros inferiores^{302,303}. Sin embargo, los fenómenos inmunológicos relacionados con el trasplante de tejidos aun supone una limitación en estas técnicas. Creemos que el C1-INH podría demostrar beneficios también en el alotrasplante de tejido compuesto y nuestro estudio podría ser la base de nuevos proyectos de investigación que apoyen esta hipótesis.

Además, el C1-INH es un fármaco que presenta las mismas características que el inhibidor de la C1 esterasa endógena, presentando por tanto, baja incidencia de efectos secundarios. En definitiva, el C1-INH podría convertirse en una opción terapéutica muy adecuada en la prevención del daño por IR.

2. Discusión de los resultados

Nuestro proyecto de investigación y el diseño del proceso experimental ha estado dirigido a evaluar el efecto terapéutico del C1-INH en la supervivencia de los colgajos cutáneos microvascularizados tras ser sometidos a un síndrome de IR. Hemos comparado la utilidad del C1-INH con una técnica de utilidad contrastada en la bibliografía, el preacondicionamiento isquémico. Y también hemos evaluado el efecto de ambas intervenciones terapéuticas asociadas (C1-INH y preacondicionamiento). Para ello, se ha utilizado un modelo de IR en colgajo epigástrico de rata y se han valorado parámetros clínicos, bioquímicos y anatomopatológicos.

2.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN LOS GRUPOS SIN TRATAMIENTO

La reperusión tras un período de isquemia produce una respuesta inflamatoria por parte del colgajo que puede llegar a determinar la lesión del tejido y una pérdida parcial o completa del colgajo. Esta respuesta se caracteriza por la presencia de infiltrado de neutrófilos, RLO, productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico y un aumento de la permeabilidad vascular que se traduce en edema intersticial³⁰⁴.

La principal repercusión del síndrome de IR es la afectación clínica sobre el colgajo. Tras un período de isquemia prolongado y su posterior reperusión los colgajos sufren una necrosis, parcial en la mayoría de los casos, tal y como describe ampliamente la literatura^{62,85,116,284,305-308}. Nuestros resultados concuerdan con la literatura, encontrando

una mayor supervivencia en el grupo no sometido a isquemia (grupo 0) respecto al grupo con un período de isquemia de 8 horas (grupo 1). No obstante, esta diferencia del 100% de supervivencia en el grupo 0 respecto al 94% encontrada en el grupo 1, no fue significativa desde el punto de vista estadístico.

Por otra parte, y desde un punto de vista anatomopatológico, sabemos que los cambios bioquímicos intracelulares que acontecen durante la isquemia determinan la disfunción celular, edema intersticial y en última instancia necrosis tisular. La reperusión que sigue a la isquemia empeora el edema y el proceso inflamatorio³⁰⁴. En la década de los 80, los RLO eran considerados los principales mediadores del daño por IR⁸⁵. Estudios in vivo llevados a cabo a partir de los 90, demostraron la participación de una respuesta inflamatoria aguda con un aumento de polimorfonucleares neutrófilos en los tejidos³⁰⁴. Está ampliamente refrendado en la literatura científica que la depleción de neutrófilos o la inhibición de su activación mejora el daño por IR³⁰⁹⁻³¹¹. Estos resultados sugieren que la infiltración neutrofílica en los tejidos es una causa más que una consecuencia del síndrome de IR³¹². Por tanto, una mayor presencia de neutrófilos en los tejidos sometidos a IR es indicativo de una mayor daño tisular.

En nuestro estudio, encontramos un aumento significativo del edema y la infiltración neutrofílica en el grupo sometido a IR respecto al grupo 0. Estos datos resultan concordantes con la bibliografía estudiada^{85,286,307}.

El último parámetro anatomopatológico analizado es la neovascularización de los colgajos. El proceso de angiogénesis, entendido como formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, se describió por primera vez en los vasos

neoformados en la placenta en 1935³¹³. La neovascularización y la angiogénesis son procesos que han demostrado ser de importancia en la supervivencia de los colgajos^{314,315}. Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, la hipoxia, la isquemia y la estimulación de células endoteliales suponen un estímulo para la neoformación de vasos sanguíneos³¹⁶. Bajo nuestras condiciones experimentales encontramos un aumento, no significativo desde el punto de vista estadístico, de la neovascularización en los colgajos sometidos a isquemia de 8 horas que resulta congruente con la literatura expuesta.

Por último, pasamos a discutir los resultados bioquímicos extraídos de nuestro estudio experimental. El glutatión reducido o GSH es un tripéptido que juega un papel importante en la regulación del estrés oxidativo⁷⁷. Muchos estudios experimentales han demostrado que el síndrome de IR se caracteriza por una disminución en los niveles de GSH^{75,317,318}. Un estudio en rata encontró una disminución en los valores de GSH miocárdicos después de un período de isquemia de 40 minutos, seguidos de otros 40 min de perfusión, en cambio períodos de isquemia más cortos no indujeron cambios significativos del GSH³¹⁹. También en modelos experimentales de colgajos cutáneos se aprecia una disminución de los niveles de GSH^{75,284}. Además, la inhibición de su producción endógena durante la IR provocaría un incremento del daño tisular, y su administración antes de la misma lo disminuiría⁷⁸.

El malondialdehído (MDA) es un producto de peroxidación lipídica que es generado como consecuencia de la presencia de RLO del medio que destruyen los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares^{284,320}. El MDA como un producto final de la lipoperoxidación lipídica, se utiliza en la bibliografía como un indicador de daño tisular del daño por IR⁸⁵. De este modo, diversos estudios experimentales muestran cómo

al aumentar el estrés oxidativo, los niveles de MDA del colgajo se ven significativamente aumentados,^{69,85,284,305}.

La superóxido dismutasa (SOD) es un sistema enzimático encargado de la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno, reacción que constituye un importante paso en el mecanismo antioxidativo³²¹. La concentración de esta enzima disminuye en los procesos que implican un aumento del estrés oxidativo como consecuencia de su consumo como mecanismo antioxidante. Debido al aumento de radicales libres presente en el síndrome de IR, es esperable una disminución de la SOD en los tejidos sometidos a dicho daño.

Bajo nuestras condiciones experimentales, el aumento del estrés oxidativo como consecuencia de la aplicación de una isquemia de 8 horas seguida de la reperusión del colgajo, se traduce en una disminución de los niveles de GSH, un aumento del MDA y una disminución de la SOD comparado con el grupo no sometido a isquemia (grupo 0). Estas diferencias, a pesar de no encontrar significancia estadística, resulta congruente con la fisiopatología del síndrome de IR.

Como conclusión global podemos extraer que, en el grupo sometido a IR se aprecia un aumento del estrés oxidativo (expresado como aumento de la GSH y SOD y disminución del MDA), que se manifiesta anatomopatológicamente como un aumento significativo del edema e infiltración neutrofílica y clínicamente como una disminución de la supervivencia media de los colgajos.

2. 2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EN LOS GRUPOS CON TRATAMIENTO

Discusión de los resultados tras la aplicación de preconditionamiento isquémico

En 1986, Murry fue el primero en documentar el efecto protector del preconditionamiento sobre el daño por IR en miocardio¹⁵³. El preconditionamiento isquémico consiste en aplicar de manera intencionada breves períodos de isquemia sobre un tejido previos a un episodio de isquemia más prolongada. Con este procedimiento, el tejido se hace resistente a los efectos deletéreos de una isquemia mantenida y su posterior reperfusión⁶⁰.

Como ya hemos mencionado, el preconditionamiento isquémico se considera una técnica de eficacia contrastada como demuestran los estudios publicados¹⁵⁶⁻¹⁶⁰. Küntscher, apreció una mejoría significativa de la supervivencia en colgajo epigástrico de rata en los animales tratados con preconditionamiento respecto al grupo control²⁰⁶. En nuestro estudio, hemos observado un aumento de la supervivencia media de los colgajos sometidos al preconditionamiento isquémico (grupo2) comparado con el grupo sometido a IR sin ninguna intervención terapéutica (grupo 1). Esta diferencia en supervivencia de un $98 \pm 4,6\%$ en el grupo 2 frente al $94,1 \pm 9,7\%$ de supervivencia en el grupo 1, concuerda con la bibliografía pero carece de significancia estadística. Atribuimos esta limitación estadística al bajo porcentaje de necrosis encontrado en el grupo control, siendo por tanto difícil establecer una mejoría clínica de magnitud suficiente para encontrar diferencias significativas.

En el análisis anatomopatológico encontramos un aumento significativo en la neovascularización en el grupo tratado con preconditionamiento isquémico respecto al grupo control. Como hemos explicado anteriormente, la angiogénesis es un proceso muy relevante para la supervivencia de los colgajos³¹⁵. Un aumento en el número de vasos neoformados está en relación con el desarrollo de un mecanismo protector ante la IR, que se traducirá con una mayor supervivencia de los tejidos. Además, se aprecia una disminución en el edema dermoepidérmico, no significativa desde el punto de vista estadístico, en el grupo tratado que concuerda con una mejor tolerancia de este grupo a la IR frente al no tratado.

Por otra parte, el estudio de los parámetros bioquímicos encuentran un mayor estrés oxidativo, expresado como disminución de la GSH y la SOD y un aumento del MDA, en el grupo tratado con preconditionamiento frente al grupo control, sin encontrar significancia estadística. Este aumento del estrés oxidativo se explica por el mayor número de reperfusiones que sufren los colgajos sometidos al preconditionamiento frente a un único episodio de perfusión en los colgajos sometidos a 8 horas de isquemia exclusivamente. La perfusión es el tratamiento definitivo de la isquemia para evitar la necrosis de los tejidos, pero además conlleva un efecto deletéreo que en ocasiones puede originar un daño añadido como ya hemos explicado. Este daño por perfusión está relacionado con la abrupta infusión en los tejidos de neutrófilos y con ellos de RLO^{67,209}. Nuestro protocolo de preconditionamiento consiste en 3 ciclos de 10 minutos de isquemia seguido de otros 10 minutos de perfusión. Con cada perfusión se establece una reentrada de neutrófilos ocasionando una liberación de RLO que generan un aumento del estrés oxidativo. En un intento de contrarrestar este estrés oxidativo se consumen GSH y SOD, lo que explica sus

niveles más bajos en el grupo tratado con preconditionamiento. Del mismo modo, se da un aumento de la lipoperoxidación de membranas que se expresa en nuestros resultados como un aumento del MDA.

De manera global, interpretamos que los resultados bioquímicos expresan una defensa ante el aumento del estrés oxidativo que supone el síndrome de IR asociado a la técnica de preconditionamiento. Y esta defensa se traduce en eficacia del tratamiento con preconditionamiento, desde el punto de vista clínico con un aumento de la supervivencia media de los colgajos y, desde el punto de vista anatomopatológico, con una disminución del edema dermoepidérmico y aumento de la neovascularización.

Discusión de los resultados tras la administración del C1-INH

Durante el proceso de isquemia tisular y la subsiguiente reperusión, la respuesta inflamatoria es el componente clave del daño tisular como ya se ha visto anteriormente. Modificaciones en esta respuesta inflamatoria, tanto a nivel celular como a nivel de mediadores de dicha inflamación, pueden determinar una disminución en el daño asociado al síndrome de IR⁶⁷.

En 1983, Smith et al identificaron depósitos de complemento en el miocardio reperfundido³²². Actualmente, se acepta que el sistema del complemento es un mediador clave en el daño originado tras la reperusión de los tejidos a través de la vía alternativa fundamentalmente. El resultado de esta activación del complemento es la formación del llamado complejo de ataque de membrana que dañan las células por medio de la creación

de microporos en sus membranas. Además, la activación del complemento determina la liberación de agentes quimiotácticos y de anafilotoxinas que inducen la degranulación de los mastocitos que produzcan, a su vez, histamina y otros mediadores de la inflamación³²³. La depleción del sistema del complemento en modelos experimentales ha demostrado una disminución en el daño por IR¹³⁶.

El C1-INH, que inicialmente fue descrito como un inhibidor fisiológico de la vía clásica del complemento³²⁴, ha demostrado también su capacidad de inhibir las vías alternativa y de las lecitinas a concentraciones superiores a las fisiológicas^{241,325}. Este hecho podría, por tanto, tener implicaciones terapéuticas en el ámbito del daño por IR entre otros. Existen numerosos estudios preclínicos en modelos animales que avalan la utilidad de este compuesto en diferentes modelos de IR¹²⁵. En cambio, no hemos encontrado referencias en la literatura acerca de la utilidad del C1-INH en colgajos.

En nuestro modelo experimental de IR en colgajo epigástrico de rata hemos podido observar a nivel clínico un aumento del porcentaje de supervivencia media de los colgajos en el grupo tratado con C1-INH (grupo 3) respecto al grupo no tratado (grupo 1), no significativo desde el punto de vista estadístico. Desde el punto de vista anatomopatológico, apreciamos una disminución en los niveles de edema y un aumento en la neovascularización de los colgajos sometidos al tratamiento con C1-INH, que tampoco alcanza significancia estadística. A pesar de la limitación estadística, estos resultados permiten intuir un efecto positivo del tratamiento con el C1-INH sobre el daño por IR en colgajos cutáneos.

Discusión de los resultados tras el tratamiento conjunto de preacondicionamiento isquémico y C1-INH

En el diseño de nuestro estudio experimental, nos pareció interesante diseñar un grupo que sumara los posibles efectos beneficiosos de los dos tratamientos en estudio (preacondicionamiento isquémico y C1-INH).

Respecto a los resultados del parámetro clínico, bajo nuestras condiciones experimentales hemos encontrado un aumento en el porcentaje de supervivencia media en el grupo tratado dualmente (grupo 4) respecto al grupo sometido a IR sin ningún tratamiento. Si bien esta diferencia no es significativa desde un punto de vista estadístico, permite intuir un probable efecto beneficioso, al igual que en las comparaciones anteriores con los grupos 2 (preacondicionamiento) y 3 (C1-INH).

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a los parámetros anatomopatológicos (edema dermoepidérmico, infiltración neutrofílica o neovascularización). No obstante, se observa un aumento del número de vasos neoformados en el grupo tratado ($p=0,134$) respecto al grupo sometido a IR sin intervención terapéutica.

Por último, los resultados bioquímicos establecen un aumento del estrés oxidativo, expresado como disminución de la GSH y SOD y aumento de MDA, en el grupo tratado con preacondicionamiento isquémico y C1-INH de manera conjunta respecto al grupo sin tratamiento. En este caso, las diferencias encontradas tienen significancia estadística para el MDA, no siendo así para GSH y SOD. De nuevo,

teniendo en consideración los resultados en los apartados anteriores, consideramos que este aumento del estrés oxidativo está en relación con la repetición de las fases de reperfusión que supone la técnica de preconditionamiento isquémico. Como ya hemos visto, cada episodio de reperfusión supone una nueva infusión de polimorfonucleares neutrófilos en el colgajo que son los principales efectores del daño oxidativo.

En un análisis combinado de todos los resultados podemos considerar que el tratamiento combinado de preconditionamiento más C1-INH se traduce desde el punto de vista bioquímico como un aumento de MDA y disminución de las sustancias antioxidantes GSH y SOD por consumo. Consideramos estos cambios bioquímicos como un mecanismo de defensa eficaz al traducirse a nivel anatomopatológico en aumento de la neovascularización y clínicamente en aumento de la supervivencia media.

2.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES OPCIONES TERAPEÚTICAS ESTUDIADAS

Con el objetivo de encontrar superioridad de alguno de los tratamientos sobre otro, hemos considerado útil el estudio comparativo entre los grupos 2, 3 y 4.

En términos de porcentajes de supervivencia media, no se ha podido establecer ninguna diferencia entre el grupo tratado con preconditionamiento isquémico, con C1-INH o con ambos tratamientos asociados.

Desde el punto de vista anatomopatológico, existe una diferencia estadísticamente significativa en la neovascularización presente en el grupo tratado con

preacondicionamiento (grupo 2) respecto al grupo sometido a ambos tratamientos (grupo 4), siendo mayor en el grupo 2. Por otra parte, se aprecia un aumento del nivel de edema dermoepidémico en el grupo 4 (ambos tratamientos asociados) respecto a los grupos 2 y 3, sin encontrar significancia estadística. Estas diferencias nos indican una superioridad del preacondicionamiento isquémico como tratamiento para el síndrome de IR, al menos desde el punto de vista anatomopatológico.

Respecto a los parámetros bioquímicos, bajo nuestras condiciones experimentales no podemos establecer diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- **La inducción del síndrome por isquemia reperusión mediante un período de isquemia de 8 horas, generó una disminución en el porcentaje de supervivencia de los colgajos, un incremento del estrés oxidativo y un daño histológico expresado como un aumento estadísticamente significativo del edema dermoepidérmico e infiltrado inflamatorio.**
- **El preconditionamiento isquémico mejoró la supervivencia de los colgajos, aumentó los marcadores de estrés oxidativo, y asoció a un aumento estadísticamente significativo de la neovascularización y un descenso del edema dermoepidérmico.**
- **La administración del inhibidor de la C1 esterasa mejoró la evolución clínica de los colgajos, acompañándose también de una reducción del edema dermoepidérmico y un aumento de la neovascularización.**
- **El tratamiento combinado del síndrome de isquemia reperusión mediante preconditionamiento isquémico e inhibidor de la C1 esterasa mejoró la supervivencia de los colgajos, pese al incremento del estrés oxidativo, y aumentó la neovascularización de los colgajos. En concreto, la neovascularización fue significativamente menor a la observada en el grupo tratado mediante preconditionamiento isquémico de forma aislada.**

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Bhishagratna KK. An English Translation of the Sushruta Samhita. Calcutta: 1916.
2. Tagliacozzi G. De Curtorum Chirurgia Per Insitionem. Venice: 1597.
3. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin flaps surgery. In: McCarthy JG, editor. Plastic Surgery, vol 1. Philadelphia: WB Saunders; 2009. pages 275–328.
4. Milton SH. Pedicled skin flaps the fallacy of the length:width ratio. The British journal of surgery 1970;57:502–8.
5. McGregor IA, Jackson IT. The groin flap. British Journal of Plastic Surgery 1972;25:3.
6. Orticochea M. The musculo-cutaneous flap method: an immediate and heroic substitute for the method of delay. British Journal of Plastic Surgery 1972;25:106–10.
7. Pontén B. The fasciocutaneous flap: its use in soft tissue defects of the lower leg. British Journal of Plastic Surgery 1981;34:215–20.
8. Manhot C. The Cutaneous Arteries of the Human Body. New York: Springer Verlag; 1983.
9. Converse JM, Littler JW. Reconstructive Plastic Surgery. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1977.
10. Tolhurst DE. A comprehensive classification of flaps: the atomic system. Plast Reconstr Surg 1987;80:608–9.
11. Cormack GC, Lamberty B. A classification of fascio-cutaneous flaps according to their patterns of vascularisation. British Journal of Plastic Surgery 1984;37:80–7.
12. Hallock GG. Principles of fascia and fasciocutaneous flap. In: J W, editor. Plastic surgery secrets. Philadelphia : Hanley and Belfus; 1999. pages 419–26.
13. Mathes SJ, Nahai F. Flap selection: analysis of features, modifications, and applications. In: Reconstructive surgery: principles, anatomy, and technique.

New York: Churchill Livingstone; 1997. pages 37–160.

14. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. *Plast Reconstr Surg* 1981;67:177–87.
15. Manchot C. *Die Hautarterien des menschlichen Körpers*. Leipzig: FCW Vogel; 1889.
16. Manchot C. *The cutaneous arteries of the human body*. New York: Springer Verlag; 1983.
17. Salmon M-M. *Artères de la peau*. Paris: Masson; 1936.
18. Salmon M. *Les artères des muscles des membres et du tronc*. Paris: Masson; 1936.
19. Sasaki GHG, Pang CYC. Experimental evidence for involvement of prostaglandins in viability and acute skin flaps: effects on viability and mode of action. *Plast Reconstr Surg* 1981;67:335–40.
20. Mellow CGC, Knight KRK, Angel MFM, O'Brien BMB. The effect of thromboxane synthetase inhibition on tolerance of skin flaps to secondary ischemia caused by venous obstruction. *Plast Reconstr Surg* 1990;86:329–34.
21. Emerson DJD, Sykes PJP. The effect of prostacyclin on experimental random pattern flaps in the rat. *British Journal of Plastic Surgery* 1981;34:264–6.
22. Senderoff DM, Israeli D, Zhang WX, Urken ML, Weinberg H. Iloprost improves survival of ischemic experimental skin flaps. *Ann Plast Surg* 1994;32:490–5.
23. Banbury JJ, Siemionow MM, Porvasnik SS, Petras SS, Zins JEJ. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. *Plast Reconstr Surg* 1999;104:730–7.
24. Hoopes JE. Pedicle flaps-an overview. In: Krizek TJ, editor. *Symposium on Basic Science in Plastic Surgery*. St Louis: C.V. Mosby; 1976. pages 241–59.
25. Palmer B, Jurell G, Norberg KA. The blood flow in experimental skin flaps in rats studied by means of the ¹³³Xenon clearance method. *Scandinavian Journal of ...* 1972;

26. Nathanson SE, Jackson RT. Blood flow measurements in skin flaps. *Arch Otolaryngol* 1975;101:354–7.
27. Kerrigan CLC, Daniel RKR. Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg* 1983;71:519–24.
28. Kerrigan CLC, Daniel RKR. Skin flap research: a candid view. *Ann Plast Surg* 1984;13:383–7.
29. Gottrup FF, Oredsson SS, Price DCD, Mathes SJS, Hohn DCD. A comparative study of skin blood flow in musculocutaneous and random pattern flaps. *Journal of Surgical Research* 1984;37:443–7.
30. Gottrup FF, Firmin RR, Hunt TKT, Mathes SJS. The dynamic properties of tissue oxygen in healing flaps. *Surgery* 1984;95:527–36.
31. Calderon WW, Chang NN, Mathes SJS. Comparison of the effect of bacterial inoculation in musculocutaneous and fasciocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 1986;77:785–94.
32. Eshima I, Mathes SJ, Paty P. Comparison of the intracellular bacterial killing activity of leukocytes in musculocutaneous and random-pattern flaps. *Plast Reconstr Surg* 1990;86:541–7.
33. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 1983;77:766–77.
34. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1980;65:152–8.
35. Kerrigan CLC, Wizman PP, Hjortdal VEV, Sampalis JJ. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg* 1994;93:1485–7.
36. Fujino T. Contribution of the axial and perforator vasculature to circulation in flaps. *Plast Reconstr Surg* 1967;39:125–37.
37. Hjortdal VE, Hauge E, Hansen ES. Differential effects of venous stasis and arterial insufficiency on tissue oxygenation in myocutaneous island flaps: an experimental study in pigs. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:521–9.
38. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Arterial ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg* 1994;93:375–85.

39. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Venous ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg* 1994;93:366–74.
40. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993;14:165–75.
41. Cohen BE, Harmon CS, Phizackerley PJ. Glucose metabolism in experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1983;71:79–86.
42. Im MJ, Su CT, Hoopes JE, Anthenelli RM. Skin-flap metabolism in rats: oxygen consumption and lactate production. *Plast Reconstr Surg* 1983;71:685–8.
43. Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg* 1999;104:2079–91.
44. Myers MB, Cherry G. Mechanism of the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 1969;44:52–7.
45. Rees TD, Liverett DM, Guy CL. The effect of cigarette smoking on skin-flap survival in the face lift patient. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:911–5.
46. Chang LD, Buncke G, Slezak S, Buncke HJ. Cigarette smoking, plastic surgery, and microsurgery. *J Reconstr Microsurg* 1996;12:467–74.
47. Chang DW, Reece GP, Wang B, Robb GL, Miller MJ, Evans GR, et al. Effect of smoking on complications in patients undergoing free TRAM flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:2374–80.
48. Cornejo CJ, Kierney PC, Vedder NB, Winn RK. Mild hypothermia during reperfusion reduces injury following ischemia of the rabbit ear. *Shock* 1998;9:116–20.
49. Mes LG. Improving flap survival by sustaining cell metabolism within ischemic cells: a study using rabbits. *Plast Reconstr Surg* 1980;65:56–65.
50. Nancarrow JD. Augmentation of island flaps by pre-operative cell membrane stabilisation: an experimental study in rats. *British Journal of Plastic Surgery* 1981;34:212–4.
51. Nakatsuka T, Pang CY, Neligan P, Lindsay WK, Zuker RM. Effect of glucocorticoid treatment on skin capillary blood flow and viability in cutaneous and myocutaneous flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 1985;76:374–85.

52. Rothkopf DMD, Chu BB, Bern SS, May JWJ. The effect of dextran on microvascular thrombosis in an experimental rabbit model. *Plast Reconstr Surg* [Internet] 1993;92:511–5. Available from: http://journals.lww.com/plasreconsurg/Abstract/1993/09000/The_Effect_of_Dextran_on_Microvascular_Thrombosis.21.aspx
53. Pomerance J, Truppa K, Bilos ZJ, Vender MI, Ruder JR, Sagerman SD. Replantation and revascularization of the digits in a community microsurgical practice. *J Reconstr Microsurg* 1997;13:163–70.
54. Das SK, Miller JH. Current status of topical antithrombotic agents in microvascular surgery. *Microsurgery* 1994;15:630–2.
55. Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, Landis JR, Yeramian P, Ingram D, et al. A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:711–21.
56. Lee C, Mehran RJ, Lessard ML, Kerrigan CL. Leeches: controlled trial in venous compromised rat epigastric flaps. *British Journal of Plastic Surgery* 1992;45:235–8.
57. Batchelor AG, Davison P, Sully L. The salvage of congested skin flaps by the application of leeches. *British Journal of Plastic Surgery* 1984;37:358–60.
58. Arslan E, Basterzi Y, Aksoy A, Majka C, Unal S, Sari A, et al. The additive effects of carnitine and ascorbic acid on distally burned dorsal skin flap in rats. *Med Sci Monit* 2005;11:BR176–80.
59. Schlenker JD, Reus WF. Blood flow after warm ischemia in island flaps: latissimus dorsi myocutaneous and epigastric flaps in the dog. *Ann Plast Surg* 1983;10:55–64.
60. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004;24:468–75.
61. Angel MF, knight KR, Amiss LR, Morgan RF. Further investigation of secondary venous obstruction. *Microsurgery* 1992;13:255–7.
62. Yoshida WB, Campos EBP de. Ischemia and reperfusion in skin flaps: effects of mannitol and vitamin C in reducing necrosis area in a rat experimental model. *Acta Cir Bras* 2005;20:358–63.
63. Nahabedian MY, Momen B, Manson PN. Factors associated with

anastomotic failure after microvascular reconstruction of the breast. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:74–82.

64. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJ, Davis JM, Fantini GA. Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: role of leukocytes and leukotrienes. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:1485–93–discussion1494–5.
65. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg* 1989;5:79–84.
66. Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR. Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg* 1993;92:1162–72.
67. Carroll WR, Esclamado RM. Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. *Head Neck* 2000;22:700–13.
68. Ozmen S, Ayhan S, Demir Y, Siemionow M, Atabay K. Impact of gradual blood flow increase on ischaemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008;61:939–48.
69. Aydogan H, Gurlek A, Parlakpinar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N, et al. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007;60:563–8.
70. Feng G-M, Yang W-G, Huan-Tang Chen S, Chu Y-M, Tsai L-M, Chang T-M, et al. Periodic alterations of jejunal mucosa morphology following free microvascular transfer for pharyngoesophageal reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2006;59:1312–7.
71. Harder Y, Amon M, Laschke MW, Schramm R, Rücker M, Wettstein R, et al. An old dream revitalised: preconditioning strategies to protect surgical flaps from critical ischaemia and ischaemia-reperfusion injury. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008;61:503–11.
72. Gillespie MN, Kojima S, Owasoyo JO, Tai HH, Jay M. Hypoxia provokes leukotriene-dependent neutrophil sequestration in perfused rabbit hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:812–6.
73. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986;251:G567–74.
74. Tangney CC, Hankins JS, Murtaugh MA, Piccione W. Plasma vitamins E

- and C concentrations of adult patients during cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Nutr* 1998;17:162–70.
75. Coban YK, Kurutas EB, Ciralik H. Ischemia-reperfusion injury of adipofascial tissue: an experimental study evaluating early histologic and biochemical alterations in rats. *Mediators Inflamm* 2005;2005:304–8.
 76. Chew BP, Park JS. Carotenoid action on the immune response. *J Nutr* 2004;134:257S–261S.
 77. Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:274–82.
 78. Ramires PR, Ji LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H679–88.
 79. De Celle T, Heeringa P, Strzelecka AE, Bast A, Smits JF, Janssen BJ. Sustained protective effects of 7-monohydroxyethylrutoside in an in vivo model of cardiac ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2004;494:205–12.
 80. Hsieh Y-H, Huang S-S, Wei F-C, Hung L-M. Resveratrol attenuates ischemia - reperfusion-induced leukocyte - endothelial cell adhesive interactions and prolongs allograft survival across the MHC barrier. *Circ J* 2007;71:423–8.
 81. Weinbroum AA, Kidron A, Hochhauser E, Hochman A, Rudick V, Vidne BA. Liver glutathione level influences myocardial reperfusion injury following liver ischemia-reperfusion. *Med Sci Monit* 2001;7:1137–44.
 82. Ozmen D, Boydak B, Mutaf I, Zoghi M, Kumanlioğlu K, Güner I, et al. The state of lipid peroxidation and antioxidants following thrombolytic therapy with rt-PA and streptokinase in acute myocardial infarction. *Jpn Heart J* 1999;40:267–73.
 83. Rhoden EL, Pereira-Lima L, Telöken C, Lucas ML, Belló-Klein A, Rhoden CR. Beneficial effect of alpha-tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *Jpn J Pharmacol* 2001;87:164–6.
 84. Cetinkale O, Bilgic L, Bolayirli M, Sengul R, Ayan F, Burcak G. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:153–60.
 85. Cetin C, Köse AA, Aral E, Colak O, Erçel C, Karabağlı Y, et al. Protective

- effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg* 2001;47:540–6.
86. Manson PN, Narayan KK, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. Improved survival in free skin flap transfers in rats. *Surgery* 1986;99:211–5.
 87. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985;201:357–9.
 88. Im MJ, Beil RJ, Wong L, Angel MF, Manson PN. Effects of sympathetic denervation and oxygen free radicals on neovascularization in skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1993;92:736–41–discussion742–3.
 89. Sumer BD, Gastman BR, Gao F, Haughey BH, Paniello RC, Nussenbaum B. Caspase inhibition enhances ischemic tolerance of fasciocutaneous flaps. *Laryngoscope* 2005;115:1358–61.
 90. Zaccaria A, Weinzweig N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin C reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg* 1994;33:620–3.
 91. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15–26.
 92. Shin MS, Angel MF, Im MJ, Manson PN. Effects of 21-aminosteroid U74389F on skin-flap survival after secondary ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1994;94:661–6.
 93. Dolan R, Hartshorn K, Andry C, Tablante J, Grillone G, McAvoy D, et al. In vivo correlation of neutrophil receptor expression, ischemia-reperfusion injury, and selective 5-lipoxygenase inhibition in guinea pigs. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:1377–80.
 94. Askar I, Oktay MF, Gurlek A, Bac B. Protective effects of some antineoplastic agents on ischemia-reperfusion injury in epigastric island skin flaps. *Microsurgery* [Internet] 2006;26:193–9. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16518803&retmode=ref&cmd=prlinks>
 95. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil

- depletion in the dog. *Circulation* 1983;67:1016–23.
96. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068–101.
 97. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301–14.
 98. Vedder NB, Winn RK, Sharar SR. β_2 -Integrins in neutrophil adhesion and their role in ischemia-reperfusion and trauma. In: Seiss W, Lorenz R, Weber PC, editors. *Adhesion Molecules and Cell Signalling: Biology and Clinical Applications*. Frankfurt: Raven Press; 1995. pages 127–40.
 99. Vedder NB, Harlan JM. Neutrophil-endothelial interactions. In: shoemaker WC, Ayres SM, Grenvik A, Holbrook PR, editors. *Critical Care*. Philadelphia: WB Saunders; 1999. pages 570–7.
 100. Harlan JM. Neutrophil-mediated vascular injury. *Acta Med Scand Suppl* 1987;715:123–9.
 101. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989;83:2008–17.
 102. Harlan JM, Winn RK, Vedder NB. In vivo models of leukocyte adherence to endothelium. In: Harlan JM, Lui D, editors. *Adhesion: its role in inflammatory disease*. New York: W H Freeman; 1992. pages 117–50.
 103. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993;91:379–87.
 104. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033–6.
 105. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859–73.
 106. Andrian Von UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Torres Filho I, Butcher EC, et al. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol* 1992;263:H1034–44.
 107. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and

inflammation. *Fed Proc* 1987;46:2402–6.

108. Granger DN, Höllwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:47–63.
109. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 1991;112:749–59.
110. Roth E. The impact of L-arginine-nitric oxide metabolism on ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:97–9.
111. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, Kim BM, Tanaka T, Hiai H, et al. Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1998;101:785–92.
112. Nilsson B, Yoshida T, Delbro D, Andius S, Friman S. Pretreatment with L-arginine reduces ischemia/reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc* 1997;29:3111–2.
113. Kim EK, Hong JP. The effect of recombinant human erythropoietin on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat TRAM flap model. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:1774–81.
114. Kuo Y-R, Wang F-S, Jeng S-F, Lutz BS, Huang H-C, Yang KD. Nitrosoglutathione improves blood perfusion and flap survival by suppressing iNOS but protecting eNOS expression in the flap vessels after ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004;135:437–46.
115. Meldrum DG, Stephenson LL, Zamboni WA. Effects of L-NAME and L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:935–40.
116. Mittermayr R, Valentini D, Fitzal F, Hallström S, Gasser H, Redl H. Protective effect of a novel NO-donor on ischemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model. *Wound Repair Regen* 2003;11:3–10.
117. Kuo Y-R, Wang F-S, Jeng S-F, Lutz BS, Huang H-C, Yang KD. Nitrosoglutathione promotes flap survival via suppression of reperfusion injury-induced superoxide and inducible nitric oxide synthase induction. *J Trauma* 2004;57:1025–31.
118. Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, Punz A, Blumer R, Mittlböck M, et al. Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies

- ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2004;39:868–77.
119. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE. The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:1227–33.
120. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109–42.
121. Chou C-H, Chen L-E, Seaber AV, Urbaniak JR. Effect of a nitric oxide donor on microcirculation of acutely denervated skeletal muscle during reperfusion. *J Reconstr Microsurg* 2002;18:53–60.
122. Khiabani KT, Kerrigan CL. The effects of the nitric oxide donor SIN-1 on ischemia-reperfused cutaneous and myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002;110:169–76.
123. Kubes P, Payne D, Grisham MB, Jourdain D, Fox-Robichaud A. Inhaled NO impacts vascular but not extravascular compartments in postischemic peripheral organs. *Am J Physiol* 1999;277:H676–82.
124. Qi S, Sun W. The effects of inhaled nitric oxide on cardiac pathology and energy metabolism in a canine model of smoke inhalation injury. *Burns* 2004;30:65–71.
125. Banz Y, Rieben R. Role of complement and perspectives for intervention in ischemia-reperfusion damage. *Ann Med [Internet]* 2012;44:205–17. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07853890.2010.535556>
126. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1058–66.
127. Heijnen BHM, Straatsburg IH, Padilla ND, Van Mierlo GJ, Hack CE, Van Gulik TM. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clin Exp Immunol* 2006;143:15–23.
128. Lagrand WK, Niessen HW, Wolbink GJ, Jaspars LH, Visser CA, Verheugt FW, et al. C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:97–103.
129. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Carson GR, Concino MF, et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of

- complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 1990;249:146–51.
130. Huang J, Kim LJ, Mealey R, Marsh HC, Zhang Y, Tenner AJ, et al. Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science* 1999;285:595–9.
 131. Ducruet AF, Mocco J, Mack WJ, Coon AL, Marsh HC, Pinsky DJ, et al. Pre-clinical evaluation of an sLe x-glycosylated complement inhibitory protein in a non-human primate model of reperfused stroke. *J Med Primatol* 2007;36:375–80.
 132. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Marsh HC, Thiemermann C. Reduction of myocardial infarct size with sCR1sLe(x), an alternatively glycosylated form of human soluble complement receptor type 1 (sCR1), possessing sialyl Lewis x. *Br J Pharmacol* 1999;128:945–52.
 133. Buerke M, Schwertz H, Seitz W, Meyer J, Darius H. Novel small molecule inhibitor of C1s exerts cardioprotective effects in ischemia-reperfusion injury in rabbits. *J Immunol* 2001;167:5375–80.
 134. Proctor LM, Arumugam TV, Shiels I, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2004;142:756–64.
 135. Ducruet AF, Hassid BG, Mack WJ, Sosunov SA, Otten ML, Fusco DJ, et al. C3a receptor modulation of granulocyte infiltration after murine focal cerebral ischemia is reperfusion dependent. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:1048–58.
 136. Amsterdam EA, Stahl GL, Pan HL, Rendig SV, Fletcher MP, Longhurst JC. Limitation of reperfusion injury by a monoclonal antibody to C5a during myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol* 1995;268:H448–57.
 137. Ferraresso M, Macor P, Valente M, Barbera Della M, D'Amelio F, Borghi O, et al. Posttransplant ischemia-reperfusion injury in transplanted heart is prevented by a minibody to the fifth component of complement. *Transplantation* 2008;86:1445–51.
 138. Arumugam TV, Shiels IA, Strachan AJ, Abbenante G, Fairlie DP, Taylor SM. A small molecule C5a receptor antagonist protects kidneys from ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int* 2003;63:134–42.

139. De Simoni MG, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Echart C, Bergamaschini L. The powerful neuroprotective action of C1-inhibitor on brain ischemia-reperfusion injury does not require C1q. *Am J Pathol* 2004;164:1857–63.
140. Castellano G, Melchiorre R, Loverre A, Ditunno P, Montinaro V, Rossini M, et al. Therapeutic targeting of classical and lectin pathways of complement protects from ischemia-reperfusion-induced renal damage. *Am J Pathol* 2010;176:1648–59.
141. Horstick G, Heimann A, Götze O, Hafner G, Berg O, Böhmer P, et al. Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation* 1997;95:701–8.
142. Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol* 2007;25:1256–64.
143. Fitch JC, Rollins S, Matis L, Alford B, Aranki S, Collard CD, et al. Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1999;100:2499–506.
144. Shernan SK, Fitch JCK, Nussmeier NA, Chen JC, Rollins SA, Mojcik CF, et al. Impact of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, on total mortality and adverse cardiovascular outcomes in cardiac surgical patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2004;77:942–9–discussion949–50.
145. Testa L, Van Gaal WJ, Bhindi R, Biondi-Zoccai GGL, Abbate A, Agostoni P, et al. Pexelizumab in ischemic heart disease: a systematic review and meta-analysis on 15,196 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:884–93.
146. Lazar HL, Bokesch PM, van Lenta F, Fitzgerald C, Emmett C, Marsh HC, et al. Soluble human complement receptor 1 limits ischemic damage in cardiac surgery patients at high risk requiring cardiopulmonary bypass. *Circulation* 2004;110:II274–9.
147. Lazar HL, Keilani T, Fitzgerald CA, Shapira OM, Hunter CT, Shemin RJ, et al. Beneficial effects of complement inhibition with soluble complement receptor 1 (TP10) during cardiac surgery: is there a gender difference? *Circulation* 2007;116:I83–8.

148. Bauernschmitt R, Böhrer H, Hagl S. Rescue therapy with C1-esterase inhibitor concentrate after emergency coronary surgery for failed PTCA. *Intensive Care Med* 1998;24:635–8.
149. de Zwaan C, Kleine AH, Diris JHC, Glatz JFC, Wellens HJJ, Strengers PFW, et al. Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2002;23:1670–7.
150. Thielmann M, Marggraf G, Neuhäuser M, Forkel J, Herold U, Kamler M, et al. Administration of C1-esterase inhibitor during emergency coronary artery bypass surgery in acute ST-elevation myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:285–93.
151. van den Heuvel MGW, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RRWJ. Review: Ischaemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62:721–6.
152. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:943–8.
153. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–36.
154. Lloris-Carsí JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;25:3303–4.
155. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol* 1997;79:842–7.
156. Carroll CM, Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G, Barker JH. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:58–65.
157. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;107:549–52.
158. Wang WZ, Anderson G, Firrell JC, Tsai TM. Ischemic preconditioning versus intermittent reperfusion to improve blood flow to a vascular isolated skeletal muscle flap of rats. *J Trauma* 1998;45:953–9.

159. Wang WZ, Anderson G, Maldonado C, Barker J. Attenuation of vasospasm and capillary no-reflow by ischemic preconditioning in skeletal muscle. *Microsurgery* 1996;17:324–9.
160. Zahir KS, Syed SA, Zink JR, Restifo RJ, Thomson JG. Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flaps in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:140–50–discussion151–2.
161. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on Ischemia-Reperfusion Injury for the Plastic Surgeon. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:685e–692e.
162. Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, Sargin M, Aydin A, Eken A, et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2007;139:274–9.
163. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2007;47:108–12.
164. Park JW, Qi W-N, Cai Y, Zelko I, Liu JQ, Chen L-E, et al. Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H181–7.
165. Kingston R, Kearns S, Kelly C, Murray P. Effects of systemic and regional taurine on skeletal muscle function following ischaemia-reperfusion injury. *J Orthop Res* 2005;23:310–4.
166. Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. *J Surg Res* 2007;137:109–16.
167. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL. Melatonin reduces ischemia/reperfusion-induced superoxide generation in arterial wall and cell death in skeletal muscle. ... of pineal research 2006;
168. Wang WZ, Fang X-H, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res* 2005;39:57–65.
169. Erkanli K, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res* 2005;39:238–42.
170. Barker JH, Gu JM, Anderson GL, O'Shaughnessy M, Pierangeli S, Johnson

- P, et al. The effects of heparin and dietary fish oil on embolic events and the microcirculation downstream from a small-artery repair. *Plast Reconstr Surg* 1993;91:335–43.
171. Lepore DA, knight KR, ritz M. A drug infusion study to improve the survival of ischemic rabbit epigastric skin flaps. In: *Progress in Microcirculation Research*. Sydney: University New South Wales Press; 1993. pages 132–3.
 172. Lepore DA, knight KR, Bhattacharya S, ritz M, Robbins SP, Sieg P, et al. Drug mixture which improves survival of ischemic rabbit epigastric skin flaps. *Microsurgery* 1994;15:685–92.
 173. Fu K, Izquierdo R, Walenga JM, Fareed J. Comparative study on the use of anticoagulants heparin and recombinant hirudin in a rabbit traumatic anastomosis model. *Thromb Res* 1995;78:421–8.
 174. Shalom A, Friedman T, Westreich M. Effect of aspirin and heparin on random skin flap survival in rats. *Dermatol Surg* 2008;34:785–90–discussion790.
 175. Shalom AA, Friedman TT, Westreich MM. The effect of postoperative aspirin on random pattern flaps in rats. *Am Surg* 2007;73:1126–8.
 176. Akan MM, Cakir BB, Misirlioğlu AA, Yildirim SS, Taylan GG, Aköz TT. Effects of clopidogrel and high dose aspirin on survival of skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2004;39:7–10.
 177. Wang WZ, Fang X-H, Stephenson LL, Zhang X, Williams SJ, Baynosa RC, et al. Nitrite attenuates ischemia-reperfusion-induced microcirculatory alterations and mitochondrial dysfunction in the microvasculature of skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:279e–287e.
 178. Bouachour GG, Cronier PP, Gouello JPJ, Toulemonde JLJ, Talha AA, Alquier PP. Hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injuries: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *J Trauma* 1996;41:333–9.
 179. Waterhouse MA, Zamboni WA, Brown RE. The use of HBO in compromised free tissue transfer and replantation, a clinical review. *Undersea and Hyperbaric Med* 1993;64.
 180. Thom SR. Hyperbaric Oxygen: Its Mechanisms and Efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:131S–141S.

181. Kalns J, Lane J, Delgado A, Scruggs J, Ayala E, Gutierrez E, et al. Hyperbaric oxygen exposure temporarily reduces Mac-1 mediated functions of human neutrophils. *Immunol Lett* 2002;83:125–31.
182. Labrousche S, Javorschi S, Leroy D, Gbikpi-Benissan G, Freyburger G. Influence of hyperbaric oxygen on leukocyte functions and haemostasis in normal volunteer divers. *Thromb Res* 1999;96:309–15.
183. Thom SR. Leukocytes in carbon monoxide-mediated brain oxidative injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;123:234–47.
184. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg* 1993;91:1110–23.
185. Buras JA, Holt D, Orlow D, Belikoff B, Pavlides S, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen protects from sepsis mortality via an interleukin-10-dependent mechanism. *Crit Care Med* 2006;34:2624–9.
186. Ross RM, McAllister TA. Protective action of hyperbaric oxygen in mice with pneumococcal septicaemia. *Lancet* 1965;1:579–81.
187. Thom SRS, Lauermann MWM, Hart GBG. Intermittent hyperbaric oxygen therapy for reduction of mortality in experimental polymicrobial sepsis. *J Infect Dis* 1986;154:504–10.
188. Benson RM, Minter LM, Osborne BA, Granowitz EV. Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin Exp Immunol* 2003;134:57–62.
189. Lahat N, Bitterman H, Yaniv N, Kinarty A, Bitterman N. Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from rat macrophages. *Clin Exp Immunol* 1995;102:655–9.
190. Weisz G, Lavy A, Adir Y, Melamed Y, Rubin D, Eidelman S, et al. Modification of in vivo and in vitro TNF-alpha, IL-1, and IL-6 secretion by circulating monocytes during hyperbaric oxygen treatment in patients with perianal Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1997;17:154–9.
191. Cabigas BP, Su J, Hutchins W, Shi Y, Schaefer RB, Recinos RF, et al. Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: role of nitric oxide synthase 3. *Cardiovasc Res* 2006;72:143–51.

192. Gregorevic P, Lynch GS, Williams DA. Hyperbaric oxygen modulates antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol* 2001;86:24–7.
193. Hirata T, Cui YJ, Funakoshi T, Mizukami Y, Ishikawa Y-I, Shibasaki F, et al. The temporal profile of genomic responses and protein synthesis in ischemic tolerance of the rat brain induced by repeated hyperbaric oxygen. *Brain Res* 2007;1130:214–22.
194. Kim CH, Choi H, Chun YS, Kim GT, Park JW, Kim MS. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Arch* 2001;442:519–25.
195. Nie H, Xiong L, Lao N, Chen S, Xu N, Zhu Z. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:666–74.
196. Yu S-Y, Chiu J-H, Yang S-D, Yu H-Y, Hsieh C-C, Chen P-J, et al. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 2005;128:28–36.
197. Hart K, Baur D, Hodam J, Lesoon-Wood L, Parham M, Keith K, et al. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope* 2006;116:522–8.
198. Kawabata H, knight KR, Coe SA, Angus JA, O'Brien BM. Experience with calcium antagonists nitrendipine, diltiazem, and verapamil and beta 2-agonist salbutamol in salvaging ischemic skin flaps in rabbits. *Microsurgery* 1991;12:160–3.
199. Emery FM, Kodey TR, Bomberger RA, McGregor DB. The effect of nifedipine on skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:61–3.
200. Goshen J, Wexler MR, Peled IJ. The use of two alpha blocking agents, phenoxybenzamine and phentolamine, in ointment and injection form to improve skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg* 1985;15:431–5.
201. Karacaoğlu N, Akbaş H. Effect of parenteral pentoxifylline and topical nitroglycerin on skin flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:272–4.
202. Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin

- flaps in rats. *Arch Facial Plast Surg* 1999;1:27–32.
203. Menger MDM, Lehr HAH, Messmer KK. Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury. *Klin Wochenschr* 1991;69:1050–5.
 204. Keshavjee S, Davis RD, Zamora MR, de Perrot M, Patterson GA. A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:423–8.
 205. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993;87:893–9.
 206. Küntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G. Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 2002;109:2398–404.
 207. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:1264–72.
 208. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993;72:1293–9.
 209. Wang WZ. Investigation of reperfusion injury and ischemic preconditioning in microsurgery. *Microsurgery* 2009;29:72–9.
 210. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003;83:1113–51.
 211. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion Injury. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:1024–33.
 212. Brown JM, Anderson BO, Repine JE, Shanley PF, White CW, Grosso MA, et al. Neutrophils contribute to TNF induced myocardial tolerance to ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:485–95.
 213. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB life* 2008;60:199–203.
 214. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000;87:972–83.

215. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 1999;33:556–64.
216. Dickson EW, Lorbar M, Porcaro WA, Fenton RA, Reinhardt CP, Gysembergh A, et al. Rabbit heart can be "preconditioned" via transfer of coronary effluent. *Am J Physiol* 1999;277:H2451–7.
217. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1571–6.
218. Bock SC, Skriver K, Nielsen E, Thøgersen HC, Wiman B, Donaldson VH, et al. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 1986;25:4292–301.
219. Schapira M, de Agostini A, Schifferli JA, Colman RW. Biochemistry and pathophysiology of human C1 inhibitor: current issues. *Complement* 1985;2:111–26.
220. Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC, Schreuder WO, Felt-Bersma RJ, Abbink JJ, et al. Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. *J Clin Invest* 1989;84:443–50.
221. Sim RB, Reboul A, Arlaud GJ, Villiers CL, Colomb MG. Interaction of 125I-labelled complement subcomponents C-1r and C-1s with protease inhibitors in plasma. *FEBS Lett* 1978;97:111–5.
222. van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN. Inactivation of kallikrein in human plasma. *J Clin Invest* 1983;71:149–58.
223. Pixley RA, Schapira M, Colman RW. The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 1985;260:1723–9.
224. Wagenaar-Bos IGA, Hack CE. Structure and function of C1-inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26:615–32.
225. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 2000;407:923–6.
226. de Smet BJB, de Boer JPJ, Agterberg JJ, Rigter GG, Bleeker WKW, Hack CEC. Clearance of human native, proteinase-complexed, and proteolytically inactivated C1-inhibitor in rats. *Blood* 1992;81:56–61.

227. Ratnoff OD, Lepow IH. Some properties of an esterase derived from preparations of the first component of complement. *J Exp Med* 1957;106:327–43.
228. Ziccardi RJR. Activation of the early components of the classical complement pathway under physiologic conditions. *J Immunol* 1981;126:1769–73.
229. Kerr FK, Thomas AR, Wijeyewickrema LC, Whisstock JC, Boyd SE, Kaiserman D, et al. Elucidation of the substrate specificity of the MASP-2 protease of the lectin complement pathway and identification of the enzyme as a major physiological target of the serpin, C1-inhibitor. *Mol Immunol* 2008;45:670–7.
230. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Teraï I, Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 2000;165:2637–42.
231. Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Vorup-Jensen T, Koch C, Jensenius JC. Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Mol Immunol* 2000;37:803–11.
232. Gigli I, Mason JW, Colman RW, Austen KF. Interaction of plasma kallikrein with the C1 inhibitor. *J Immunol* 1970;104:574–81.
233. Harpel PCP, Lewin MFM, Kaplan APA. Distribution of plasma kallikrein between C-1 inactivator and alpha 2-macroglobulin in plasma utilizing a new assay for alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes. *J Biol Chem* 1985;260:4257–63.
234. McConnell DJ. Inhibitors of kallikrein in human plasma. *Journal of Clinical Investigation* 1972;
235. Schapira M, Despland E, Scott CF, Boxer LA, Colman RW. Purified human plasma kallikrein aggregates human blood neutrophils. *J Clin Invest* 1982;69:1199–202.
236. Landerman N, Webster MM, Becker E, Ratcliffe H. Hereditary angioneurotic edema. II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. *J Allergy (Cairo)* 1962;33:330–41.
237. Harpel PCP, Cooper NRN. Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C1s, plasmin, and trypsin. *J*

Clin Invest 1975;55:593–604.

- 238. Huisman LG, van Griensven JM, Kluft C. On the role of C1-inhibitor as inhibitor of tissue-type plasminogen activator in human plasma. *Thromb Haemost* 1995;73:466–71.
- 239. Rånby M, Bergsdorf N, Nilsson T. Enzymatic properties of the one-and two-chain form of tissue plasminogen activator. *Thromb Res* 1982;
- 240. Sulikowski T, Patston PA. The inhibition of TNK-t-PA by C1-inhibitor. *Blood coagulation & fibrinolysis* 2001;
- 241. Jiang H, Wagner E, Zhang H, Frank MM. Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J Exp Med* 2001;194:1609–16.
- 242. Patston PA, Schapira M. Regulation of C1-inhibitor function by binding to type IV collagen and heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:597–601.
- 243. Hauert J, Patston PA, Schapira M. C1 inhibitor cross-linking by tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 2000;275:14558–62.
- 244. Chang NS, Boackle RJ, Leu RW. Characterization of C1 inhibitor binding to neutrophils. *Immunology* 1991;73:95–101.
- 245. Liu D, Lu F, Qin G, Fernandes SM, Li J, Davis AE. C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J Immunol* 2007;179:3966–72.
- 246. Bergamaschini L, Gobbo G, Gatti S, Caccamo L, Prato P, Maggioni M, et al. Endothelial targeting with C1-inhibitor reduces complement activation in vitro and during ex vivo reperfusion of pig liver. *Clin Exp Immunol* 2001;126:412–20.
- 247. Cai S, Dole VS, Bergmeier W, Scafidi J, Feng H, Wagner DD, et al. A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J Immunol* 2005;174:6462–6.
- 248. Lathem WWW, Grys TET, Witowski SES, Torres AGA, Kaper JBJ, Tarr PIP, et al. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* 2002;45:277–88.
- 249. Lathem WWW, Bergsbaken TT, Welch RAR. Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *J Exp Med* 2004;199:1077–87.

250. Liu D, Cai S, Gu X, Scafidi J, Wu X, Davis AE. C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003;171:2594–601.
251. Marr N, Luu RA, Fernandez RC. Bordetella pertussis binds human C1 esterase inhibitor during the virulent phase, to evade complement-mediated killing. *J Infect Dis* 2007;195:585–8.
252. Davis AE III, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 2008;45:4057–63.
253. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev* 2000;52:91–112.
254. Caliezi C, Zeerleder S, Redondo M, Regli B, Rothen H-U, Zürcher-Zenklusen R, et al. C1-inhibitor in patients with severe sepsis and septic shock: beneficial effect on renal dysfunction. *Crit Care Med* 2002;30:1722–8.
255. Woo P, Lachmann PJ, Harrison RA, Amos N, Cooper C, Rosen FS. Simultaneous turnover of normal and dysfunctional C1 inhibitor as a probe of in vivo activation of C1 and contact activatable proteases. *Clin Exp Immunol* 1985;61:1–8.
256. Falus A, Rokita H, Walcz E, Brozik M, Hidvégi T, Merétey K. Hormonal regulation of complement biosynthesis in human cell lines--II. Upregulation of the biosynthesis of complement components C3, factor B and C1 inhibitor by interleukin-6 and interleukin-1 in human hepatoma cell line. *Mol Immunol* 1990;27:197–201.
257. Kalter ES, Daha MR, Cate ten JW, Verhoef J, Bouma BN. Activation and inhibition of Hageman factor-dependent pathways and the complement system in uncomplicated bacteremia or bacterial shock. *J Infect Dis* 1985;151:1019–27.
258. Hack CE. Inhibitor substitution in sepsis. *Intensive Care Med* 1993;19 Suppl 1:S1–2.
259. Dalmaso AP, Platt JL. Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor. *Transplantation* 1993;56:1171–6.

260. Fukuta D, Miyagawa S, Yamada M, Matsunami K, Kurihara T, Shirasu A, et al. Effect of various forms of the C1 esterase inhibitor (C1-INH) and DAF on complement mediated xenogeneic cell lysis. *Xenotransplantation* 2003;10:132–41.
261. Matsunami K, Miyagawa S, Yamada M, Yoshitatsu M, Shirakura R. A surface-bound form of human C1 esterase inhibitor improves xenograft rejection. *Transplantation* 2000;69:749–55.
262. Fiane AEA, Videm VV, Johansen HTH, Mellbye OJO, Nielsen EWE, Mollnes TET. C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. *Immunopharmacology* 1999;42:231–43.
263. Buerke M, Prüfer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H. Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:429–38.
264. Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:393–402.
265. Horstick G, Berg O, Heimann A, Götze O, Loos M, Hafner G, et al. Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation* 2001;104:3125–31.
266. Nielsen EW, Mollnes TE, Harlan JM, Winn RK. C1-inhibitor reduces the ischaemia-reperfusion injury of skeletal muscles in mice after aortic cross-clamping. *Scand J Immunol* 2002;56:588–92.
267. Toomayan GA, Chen L-E, Jiang H-X, Qi W-N, Seaber AV, Frank MM, et al. C1-esterase inhibitor and a novel peptide inhibitor improve contractile function in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery* 2003;23:561–7.
268. Inderbitzin D, Beldi G, Avital I, Vinci G, Candinas D. Local and remote ischemia-reperfusion injury is mitigated in mice overexpressing human C1 inhibitor. *Eur Surg Res* 2004;36:142–7.
269. Lehmann TG, Heger M, Münch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia-reperfusion injury in the liver. *Transpl Int* 2000;13 Suppl 1:S547–50.

270. Akita N, Nakase H, Kaido T, Kanemoto Y, Sakaki T. Protective effect of C1 esterase inhibitor on reperfusion injury in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Neurosurgery* 2003;52:395–400–discussion400–1.
271. De Simoni MG, Storini C, Barba M, Catapano L, Arabia AM, Rossi E, et al. Neuroprotection by complement (C1) inhibitor in mouse transient brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:232–9.
272. Storini C, Rossi E, Marrella V, Distaso M, Veerhuis R, Vergani C, et al. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis* 2005;19:10–7.
273. Lauterbach M, Horstick G, Plum N, Lotz J, Lauterbach E, Weilemann LS, et al. C1-esterase inhibitor reverses functional consequences of superior mesenteric artery ischemia/reperfusion by limiting reperfusion injury and restoring microcirculatory perfusion. *Shock* 2007;27:75–83.
274. Karpel-Massler G, Fleming SD, Kirschfink M, Tsokos GC. Human C1 esterase inhibitor attenuates murine mesenteric ischemia/reperfusion induced local organ injury. *J Surg Res* 2003;115:247–56.
275. Padilla ND, van Vliet AK, Schoots IG, Valls Seron M, Maas MA, Peltenburg EEP, et al. C-reactive protein and natural IgM antibodies are activators of complement in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 2007;142:722–33.
276. Petry JJ, Wortham KA. The anatomy of the epigastric flap in the experimental rat. *Plast Reconstr Surg* 1984;74:410–3.
277. Fitzal F, Valentini D, Mittermayr R, Worseg A, Gasser IH, Redl H. Circulatory changes after prolonged ischemia in the epigastric flap. *J Reconstr Microsurg* 2001;17:535–43.
278. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
279. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214–26.
280. Recknagel RO, Glende EA, Waller RL, Lowrey K. Lipid peroxidation: biochemistry, measurement and significance in liver cell injury. In: Plaa G, Hewitt HR, editors. *Toxicology of the Liver*. New York: Toxicology of the Liver; 1982.

281. Sagi A, Ferder M, Levens D, Strauch B. Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. *Plast Reconstr Surg* 1986;77:639–44.
282. Hofeling ADA, Bello GG, Jackson II, Jackson AHA, Kim EE. Hemoglobin-based oxygen carrier does not improve survival of ischemic rat island groin flaps. *J Invest Surg* 2006;19:299–305.
283. Kuo Y-R, Jeng S-F, Wang F-S, Huang H-C, Wei F-C, Yang KD. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (abciximab) inhibited platelet activation and promoted skin flap survival after ischemia/reperfusion injury. *Journal of Surgical Research* 2002;107:50–5.
284. Gurlek A, Celik M, Parlakpinar H, Aydogan H, Bay-Karabulut A. The protective effect of melatonin on ischemia-reperfusion injury in the groin (inferior epigastric) flap model in rats. *J Pineal Res* 2006;40:312–7.
285. Fitzal F, Valentini D, Mittermayr R, Worseg A, Gasser IH, Redl H. Circulatory changes after prolonged ischemia in the epigastric flap. *J Reconstr Microsurg* 2001;17:535–43.
286. Karaaslan O, Ulusoy MG, Kankaya Y, Tiftikcioglu YO, Kocer U, Kankaya D, et al. Protective effect of grape seed extract against ischaemia/reperfusion injury in a rat epigastricflap model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010;63:705–10.
287. Mounsey RA, Pang CY, Boyd JB, Forrest C. Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimus dorsi porcine model using acute ischemic preconditioning. *J Otolaryngol* 1992;21:315–20.
288. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29:782–8.
289. Whetzel TP, Stevenson TR, Sharman RB, Carlsen RC. The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:1767–75.
290. Attkiss KJ, Suski M, Hunt TK, Buncke HJ. Ischemic preconditioning of skeletal muscle improves tissue oxygenation during reperfusion. *J Reconstr Microsurg* 1999;15:223–8.
291. Saita Y, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of

- skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *British Journal of Plastic Surgery* 2002;55:241–5.
292. Küntscher MV, Hartmann B, Germann G. Remote ischemic preconditioning of flaps: a review. *Microsurgery* 2005;25:346–52.
 293. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1995;268:H2063–7.
 294. Schroeder CA, Lee HT, Shah PM, Babu SC, Thompson CI, Belloni FL. Preconditioning with ischemia or adenosine protects skeletal muscle from ischemic tissue reperfusion injury. *J Surg Res* 1996;63:29–34.
 295. Zahir TMT, Zahir KSK, Syed SAS, Restifo RJR, Thomson JGJ. Ischemic preconditioning of musculocutaneous flaps: effects of ischemia cycle length and number of cycles. *Ann Plast Surg* 1998;40:430–5.
 296. Fu J, Lin G, Wu Z, Ceng B, Wu Y, Liang G, et al. Anti-apoptotic role for C1 inhibitor in ischemia/reperfusion-induced myocardial cell injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:504–12.
 297. Lu F, Chauhan AK, Fernandes SM, Walsh MT, Wagner DD, Davis AE. The effect of C1 inhibitor on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1042–9.
 298. Devauchelle B, Badet L, Lengelé B, Morelon E, Testelin S, Michallet M, et al. First human face allograft: early report. *Lancet* 2006;368:203–9.
 299. Siemionow M, Papay F, Alam D, Bernard S, Djohan R, Gordon C, et al. Near-total human face transplantation for a severely disfigured patient in the USA. *Lancet* 2009;374:203–9.
 300. Cavadas PC, Ibáñez J, Thione A. Surgical aspects of a lower face, mandible, and tongue allotransplantation. *J Reconstr Microsurg* 2012;28:43–7.
 301. Cavadas PC, Landin L, Thione A, Rodríguez-Pérez JC, Garcia-Bello MA, Ibáñez J, et al. The Spanish experience with hand, forearm, and arm transplantation. *Hand Clin* 2011;27:443–53–viii.
 302. Cavadas PC, Landin L, Ibáñez J. Bilateral hand transplantation: result at 20 months. *J Hand Surg Eur Vol* 2009;34:434–43.
 303. Cavadas PC, Ibáñez J, Thione A, Alfaro L. Bilateral trans-humeral arm transplantation: result at 2 years. *Am J Transplant* 2011;11:1085–90.

304. Wu X, Yu M, Li A. Protective effect of a nuclear factor-kappaB inhibitor on ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric flap model. *J Reconstr Microsurg* 2008;24:351–9.
305. D KGM, D FYM, D FAM, Guler Bugdayci M D PD, D ISM, Fahri Yimaz M D PD. Montelukast Protects Axial Pattern Rat Skin Flaps Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of Surgical Research* 2009;157:181–6.
306. Moon JG, Lim HC, Gye MR, Oh JS, Park JW. Postconditioning attenuates ischemia-reperfusion injury in rat skin flap. *Microsurgery* 2008;28:531–7.
307. Cordeiro PG, Lee JJ, Mastorakos D, Hu QY, Pinto JT, Santamaria E. Prevention of ischemia-reperfusion injury in a rat skin flap model: the role of mast cells, cromolyn sodium, and histamine receptor blockade. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:654–9.
308. Dacho A, Hanusch C, Lyutenski S, Dietz A. Pyrrolidine dithiocarbamate as an effector and trigger in ischemia-reperfusion injury in adipocutaneous flaps in rats. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;41:176–82.
309. Zamboni WA, Stephenson LL, Roth AC, Suchy H, Russell RC. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: CD 18-dependent neutrophil-endothelial adhesion and arteriolar vasoconstriction. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:2002–7–discussion2008–9.
310. Lee C, Kerrigan CL, Picard-Ami LA. Cyclophosphamide-induced neutropenia: effect on postischemic skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:1092–7.
311. Vedder NB, Bucky LP, Richey NL, Winn RK, May JW. Improved survival rates of random flaps in rabbits with a monoclonal antibody that blocks leukocyte adherence. *Plast Reconstr Surg* 1994;93:1035–40.
312. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;179:169–87.
313. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;
314. Tsur H, Daniller A, Strauch B. Neovascularization of skin flaps: route and timing. *Plast Reconstr Surg* 1980;66:85–90.
315. Baykan H, Günay GK, Ozyazgan I, Soyuer I. The effect of angiotensin (1-7) on survival of random pattern skin flaps with nicotine-induced ischemia in

- rats. *Ann Plast Surg* 2012;68:88–93.
316. Kutryk MJB, Stewart DJ. Angiogenesis of the heart. *Microsc Res Tech* 2003;60:138–58.
 317. Aydemir O, Nazıroğlu M, Çelebi S, Yılmaz T, Kükner AŞ. Antioxidant effects of alpha-, gamma-and succinate-tocopherols in guinea pig retina during ischemia-reperfusion injury. *Pathophysiology* 2004;
 318. Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, et al. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *FASEB J* 2005;19:354–61.
 319. Ko KM, Mak DH, Poon MK, Yiu HY. Altered susceptibility to ischemia-reperfusion injury in isolated-perfused hearts of short-term diabetic rats associated with changes in non-enzymatic antioxidants. *Jpn J Pharmacol* 2001;85:435–42.
 320. Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardı N, Acet A. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *J Pineal Res* 2002;33:161–6.
 321. Bilgin-Karabulut A, Ademoğlu E, Aydın I, Erer M, Gökkuşu C. Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *J Reconstr Microsurg* 2001;17:425–9.
 322. Smith GW, McArthur CJ, Simpson IJ. Circulating immune complexes in myocardial infarction. *J Clin Lab Immunol* 1983;12:197–9.
 323. Lazarus B, Messina A, Barker JE, Hurley JV, Romeo R, Morrison WA, et al. The role of mast cells in ischaemia-reperfusion injury in murine skeletal muscle. *J Pathol* 2000;191:443–8.
 324. Doekes G, van Es LA, Daha MR. C1- inactivator: its efficiency as a regulator of classical complement pathway activation by soluble IgG aggregates. *Immunology* 1983;49:215–22.
 325. Nielsen EW, Waage C, Fure H, Brekke OL. Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement. *Molecular ...* 2007;